



Caractérisation de l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 et les héparanes sulfate : importance des changements conformationnels induits par la liaison à CD4

Elodie Crublet

► To cite this version:

Elodie Crublet. Caractérisation de l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 et les héparanes sulfate : importance des changements conformationnels induits par la liaison à CD4. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00260979

HAL Id: tel-00260979

<https://theses.hal.science/tel-00260979>

Submitted on 5 Mar 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I

Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Elodie CRUBLET

Le 8 Février 2008

Caractérisation de l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 et les héparanes sulfate : importance des changements conformationnels induits par la liaison à CD4

Directeurs de thèse : Dr. Hugues LORTAT-JACOB et Dr. Romain VIVES

Membres du jury :

Rapporteurs

Dr. Fernando ARENZANA-SEISDEDOS (Institut Pasteur, Paris)
Dr. Sylvie FOURNEL-GIGLEUX (Univ. de Nancy)

Examineurs

Pr. David BONNAFFE (Univ. d'Orsay, Paris)
Pr. Emmanuel DROUET (Univ. Joseph Fourier, Grenoble)
Dr. Hugues LORTAT-JACOB (Institut de Biologie Structurale, Grenoble)
Dr. Romain VIVES (Institut de Biologie Structurale, Grenoble)

Thèse réalisée au sein du Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire
Institut de Biologie Structurale, 41 Rue Jules Horowitz 38027 GRENOBLE

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du groupe « Interactions Protéines/Glycosaminoglycanes », au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : Sylvie Fournel-Gigleux et Fernando Arenzana-Seisdedos, les rapporteurs, ainsi que David Bonnaffé, Emmanuel Drouet, Hugues Lortat-Jacob et Romain Vivès. Je remercie également l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et Sidaction pour leur soutien financier.

Bientôt cinq années passées au sein de l'IBS... Il est difficile de trouver les mots justes pour remercier tous ceux qui m'ont apporté leur soutien, professionnel comme personnel.

Je tiens, en premier lieu, à remercier Hugues, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie au sein de son équipe, de m'avoir fait confiance à l'issue du DEA et permis de poursuivre en thèse. Merci pour tes conseils scientifiques et la relecture de ce manuscrit.

Un grand merci à Romain, mon Co-D, pour tout... Ta disponibilité, ton soutien, tes avis scientifiques et tes encouragements, qui m'ont permis d'aller de l'avant. Merci également pour les nombreuses relectures de thèse, dossiers, CV et autres, ainsi que tes conseils pour mes entretiens en Angleterre.

Je souhaite également remercier les « Gagophiles », tous drôles à leur façon, certains à l'humour parfois douteux (ils se reconnaîtront)...

Stéphane, mon colocataire de couloir, bientôt 5 ans qu'on est dans la même galère. Je pense que je vais vendre mon emplacement de bureau aux enchères, aux filles du LEM... Je risque d'en tirer un bon prix !!! Ravie d'avoir partagé tous ces moments avec toi... Merci pour tout, en particulier ta présence, ton soutien et ton appart, il y a deux ans. RDV en Californie pour des cours de surf... Au fait, si tu cherches une spécialiste de la mutagenèse, je suis dispo dans les mois à venir, sans problème...

Cédric, le faux Parigo, j'espère sincèrement que tu vas devenir Grenoblois pour un bon nombre d'années. Bonne chance pour la suite et merci de m'avoir transmis tes compétences informatiques : EndNote, Paint et compagnie...

Rabia, pas toujours facile de faire la loi dans ce labo de mecs ! Heureusement que nous étions deux nanas pour leur faire face et les remettre dans le droit chemin... Continue à les mener à la baguette sans moi.

Pascal, le roi de la contrepèterie, merci pour la relecture de ma thèse et désolée pour les poissons rouges, la cafetière, le frigo... Et s'il te plaît, pense à ranger les piles de boîtes qui traînent sur ta paillasse...

Vincent, Ch'ti depuis bientôt 3 ans, tu restes membre actif des Gagophiles dans nos cœurs. Merci pour tout ce que tu as apporté au labo, les séances photos, les cours de natation dans la centri, les soirées fléchettes... Que de bons souvenirs !

Estelle, tu as passé un an au labo. J'espère t'avoir apporté un peu de mon savoir. De ton côté, tu m'as été d'une grande aide et tu m'as réconciliée avec les stagiaires ! Bonne chance pour la suite.

Merci aux membres du LEM-canal historique, en particulier à Evelyne et Isabelle, de m'avoir transmis leur savoir sur Baculo. Un grand merci également à Jean-Pierre pour sa participation au projet « Billes », ces fameuses billes qui l'ont fait enrager de nombreuses fois. Sans oublier Pierrette, Monique, Pascale, Véronique, Nicole, Ben et Thom (alias C.gauche et C.droite), Hélène, Philippe, Marie-Claire et Gérard. Ravie de vous avoir rencontrés et d'avoir partagé ces quelques années avec vous. Bon courage aux futurs thésards ; croyez moi, c'est le pied de voir le bout !!!

Je tiens également à remercier Fernando Arenzana-Seisdedos de m'avoir accueillie au sein de l'Institut Pasteur et Patricia pour sa disponibilité et ses conseils. Bonne chance pour ta thèse et pour la suite.

De façon plus personnelle...

Nanou, Agnès et Steph, mes cop's de potins malgré la distance ! Merci pour votre écoute et votre soutien ! Je crois que je suis cliente « Or » chez Bouygues Télécom (et peut-être bien chez Msn Messenger).

Coach, peu de choses à dire que tu ne saches déjà. Tu m'as tant apporté! J'espère en avoir fait de même. Merci pour ton écoute, tes conseils et ton amitié. Attention, même si je pars, le coup de pagaie ne sera jamais bien loin...

Mylène, membre 003 du CL, merci pour ta joie de vivre et ta blonditude (qui me fait me sentir moins seule). Je te charge de recruter de nouveaux adhérents pour notre club car je pense que les 3 créateurs vont bientôt s'en sortir ! Et, s'il te plaît, ne t'habille pas comme moi le jour de ma soutenance !!!

Un grand merci aux Caribous, pour les jeudis sportifs/culinaires, en particulier à Aurore et Cécile, pour les dîners de filles, et à Ju et Fab, pour leur accueil toujours chaleureux lors de mes nombreux séjours à Cambridge.

Une petite pensée pour toutes les personnes que je ne cite pas ici, mais qui ont fait partie de ma vie grenobloise pendant ces 5 ans.

Enfin, je voudrais finir en remerciant ma famille. Il n'y a pas de mots pour remercier ceux sans qui (c'est sûr !) je ne serais pas là. Papa, Maman, merci pour votre amour et votre soutien. Ma p'tite Ju, merci pour tout, merci d'être comme tu es, de me booster et me remonter le moral quand il est au plus bas. RDV en Chine... Tu vas me manquer, cocotte! Bonne chance pour cette année et profite-en bien.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	15
GLOSSAIRE	17
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	19
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	23
I- LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE	25
I-1. Historique et bilan de l'infection à VIH	27
I-1.1. Découverte des rétrovirus	27
I-1.2. Découverte du VIH	27
I-1.3. Origines et diversité du VIH	28
I-1.4. Epidémiologie	29
I-2. Le virus de l'immunodéficience humaine	30
I-2.1. La famille des rétrovirus	30
I-2.1.1. Les Oncovirus	30
I-2.1.2. Les Spumavirus	30
I-2.1.3. Les Lentivirus	31
I-2.2. Caractéristiques du virus	31
I-2.2.1. Organisation de la particule virale	31
I-2.2.2. Organisation du génome	32
I-2.2.3. Le cycle viral	34
I-2.3. Variabilité du virus	37
I-2.3.1. Mécanismes engendrant la variabilité	37
I-2.3.2. Conséquences de la variabilité : le tropisme viral	37
I-3. Pathologie du VIH	40
I-3.1. Les cellules cibles du VIH	40
I-3.1.1. Passage du virus à travers les muqueuses	40
I-3.1.2. Infection des cellules des organes lymphoïdes	43
I-3.1.3. Infection du système nerveux	44
I-3.1.4. Protection du virus et réservoirs viraux	45
I-3.2. Les différentes phases de la maladie	47
I-3.3. Le diagnostic	47
I-3.4. SIDA et maladies opportunistes	48

I-4. Les stratégies thérapeutiques	49
I-4.1. Les inhibiteurs de la réplication virale	49
I-4.2. Les inhibiteurs de l'entrée virale	51
I-4.3. Les autres cibles	58
I-4.4. Les vaccins	60
II- MECANISME DE L'ENTREE VIRALE	65
II-1. Le complexe Env	67
II-1.1. Biosynthèse et clivage endoprotéolytique du précurseur gp160	68
II-1.2. La protéine gp120	69
II-1.2.1. Structure	69
II-1.2.2. La boucle V3	73
II-1.2.3. Le rôle des glycosylations	75
II-1.3. La protéine gp41	77
II-1.3.1. Structure	77
II-1.3.2. Mécanisme de fusion	78
II-2. Les récepteurs cellulaires du VIH	80
II-2.1. Le récepteur CD4	80
II-2.1.1. Description de CD4	80
II-2.1.2. Interaction entre gp120 et CD4	82
II-2.1.3. Interaction entre CD4 et d'autres protéines virales	84
II-2.2. Les récepteurs à chimiokines	84
II-2.2.1. Découverte des corécepteurs CXCR4 et CCR5	84
II-2.2.2. Cas particulier de CCR5 : la mutation CCR5Δ32	85
II-2.2.3. Structure des récepteurs à chimiokines	86
II-2.2.4. Interaction entre gp120 et les corécepteurs	88
II-2.2.5. Les autres corécepteurs utilisés par le VIH	91
II-2.3. Les récepteurs alternatifs	91
II-3. D'autres modes d'entrée dans les cellules	95
III- ROLE DES HSPG DANS L'INFECTION PAR LE VIH	99
III-1. Structure et fonction des HSPG	101
III-1.1. Généralités sur les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes	101
III-1.2. Le core protéique des HSPG	102
III-1.2.1. Les HSPG membranaires	102
III-1.2.2. Les HSPG matriciels	106
III-1.2.3. Le cas de la sérglycine : un protéoglycane intracellulaire	107

III-1.3. Propriétés structurales des chaînes d'HS	108
III-1.3.1. Biosynthèse des chaînes d'HS	108
III-1.3.2. Organisation moléculaire des HS	111
III-1.4. Propriétés fonctionnelles des HSPG	114
III-1.4.1. Fonctions des chaînes d'HS	114
III-1.4.2. Fonctions du core protéique	118
III-1.4.3. Rôle des enzymes de remodelage	118
III-1.4.4. Les motifs de reconnaissance des HS sur les protéines	120
III-1.5. Potentiel thérapeutique des molécules dérivées des HS	121
III-1.5.1. L'héparine et ses dérivés comme agents anticoagulants	121
III-1.5.2. Les composés antitumoraux dérivés des HS	123
III-1.5.3. Autres composés mimétiques des HS à potentiel thérapeutique	125
III-2. Rôle des HS dans l'infection par des pathogènes	127
III-2.1. Interaction HS – bactéries/parasites	128
III-2.2. Interaction HS - virus	129
III-3. Rôle des HS dans l'infection par le VIH	132
III-3.1. Interaction des HS avec la protéine gp120 du VIH	132
III-3.1.1. Rôle des HS dans l'entrée virale	133
III-3.1.2. Caractérisation des sites d'interaction gp120/HS	139
III-3.2. Interaction des HS avec la protéine Tat du VIH	142
III-3.3. Intérêt thérapeutique de molécules dérivées des HS dans l'infection VIH	143
III-3.3.1. Données physiologiques	143
III-3.3.2. Propriétés antivirales des mimétiques d'HS	145
OBJECTIFS DU PROJET	149
MATERIEL ET METHODES	151
I- SYSTEME DE PRODUCTION DE PROTEINES DANS DES CELLULES S2 DE DROSOPHILES	153
I-1. Principe	153
I-2. Clonage	153
I-2.1. Amplification de l'insert par PCR	154
I-2.2. Clonage indirect dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO	155
I-2.2.1. Transformation de bactéries compétentes avec la ligation	155
I-2.2.2. Isolement de l'ADN plasmidique produit par les bactéries	155
I-2.2.3. Confirmation de la présence de l'insert dans le vecteur TOPO	155
I-2.3. Clonage dans le vecteur pMT/BiP/V5/HisA	156

I-3. Culture cellulaire	156
I-3.1. Culture des cellules S2	156
I-3.2. Transfection – Sélection	157
I-3.3. Optimisation des conditions d'expression de la protéine	158
II- SYSTEME DE PRODUCTION DE PROTEINES AVEC LA TECHNOLOGIE « BACULOVIRUS »	158
II-1. Principe	158
II-2. Clonage	160
II-2.1. Construction de pFastBac-gp120	160
II-2.2. Construction de pNT-Bac-gp120	160
II-3. Génération du bacmide recombinant	161
II-4. Culture cellulaire	162
II-4.1. Culture des cellules	163
II-4.2. Transfection	163
II-4.3. Amplification du stock viral	164
II-4.4. Titrage du virus recombinant	164
II-4.5. Production de la protéine	165
II-4.5.1. Protocole de production pour des cellules en monocouche	165
II-4.5.2. Protocole de production pour des cellules en suspension	165
III- ELECTROPHORESE ET IMMUNODETECTION DES PROTEINES	166
III-1. Analyse des protéines par électrophorèse	166
III-2. Révélation des protéines par Western Blot	166
IV- MUTAGENESE DIRIGEE	167
V- PURIFICATION DES PROTEINES	169
V-1. Séparation sur colonne échangeuse de cations : SP sépharose	169
V-2. Séparation sur colonne d'affinité : lentil-lectine	169
V-3. Séparation par chromatographie d'exclusion : Superdex 200	170
V-4. Dessalage, concentration et dosage des protéines	170
VI- PREPARATION DE BANQUES D'OLIGOSACCHARIDES	170
VI-1. Digestion enzymatique de l'héparine	170
VI-2. Purification des oligosaccharides	171
VII- ETUDE DE L'INTERACTION GP120/HEPARINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	171
VIII- BIACORE	171
VIII-1. Fonctionnalisation des surfaces	171
VIII-2. Tests d'interaction	172

IX- ETUDE DE L'INTERACTION GP120/CXCR4	172
IX-1. Analyses par cytométrie en flux	172
IX-2. Etude de la mobilisation du calcium intracellulaire dans un système cellulaire CXCR4+	173
IX-3. Chimiotaxie des cellules A3.01	174
X- ETUDE DES DOMAINES PROTEIQUES DE FIXATION A L'HEPARINE PAR LA TECHNIQUE DES BILLES	175
X-1. Méthode	175
X-2. Alternative: interaction protéine/héparine en solution	175
RESULTATS ET DISCUSSION	179
I- PRODUCTION ET PURIFICATION DE GP120 ET DE SES FORMES MUTANTES EN CELLULES D'INSECTES	181
I-1. Production de gp120 en cellules S2 de drosophiles	181
I-1.1. Conception du plasmide pMT/BiP/V5/HisA-gp120	181
I-1.2. Production	182
I-2. Production avec le système Bac-to-Bac	184
I-2.1. Conception des plasmides puis des bacmides recombinants	184
I-2.1.1. pFastBac-gp120	184
I-2.1.2. pNT-Bac-gp120	185
I-2.2. Réalisation des plasmides et bacmides mutants	186
I-2.3. Choix du type cellulaire et du plasmide le mieux adapté	187
I-2.3.1. Choix du bacmide	188
I-2.3.2. Choix du type cellulaire	189
I-2.4. Titrage des stocks viraux	190
I-2.5. Production	191
I-2.6. Purification	192
I-2.6.1. Purification sur résine échangeuse de cations	192
I-2.6.2. Purification sur résine d'affinité	194
I-2.6.3. Purification par chromatographie d'exclusion	195
I-2.6.4. Récapitulatif des différentes étapes de purification	196
I-2.6.5. Purification des autres formes recombinantes de gp120	197
II- CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE GP120	198
II-1. Etudes SPR	198
II-1.1. Principe	198
II-1.2. Etude de la forme recombinante sauvage de gp120	200

II-2. Analyse de l'interaction de gp120 avec le récepteur CXCR4	204
II-2.1. Etude de l'interaction gp120/CXCR4 par cytométrie en flux	204
II-2.2. Mobilisation de la voie du calcium	205
II-2.2.1. Principe	205
II-2.2.2. SDF-1 α induit la voie de signalisation du calcium	206
II-2.2.3. La protéine gp120 _{HXBc2} n'induit pas la voie de signalisation du calcium	208
II-2.3. Chimiotaxie	210
III- ETUDE DU SITE CD4I	212
III-1. Etude fonctionnelle des protéines mutées	213
III-2. Identification des résidus de CD4i interagissant avec l'héparine	215
III-2.1. Etude de CD4i par chromatographie d'affinité	215
III-2.2. Etudes des interactions gp120/héparine au niveau du site CD4i	217
III-2.2.1. Analyse directe	217
III-2.2.2. Analyse indirecte	219
III-2.2.3. Taille optimale des polysaccharides pour inhiber l'interaction CD4i/17b	221
III-3. Etude du site CD4i par la « méthode des billes »	222
III-3.1. Principe	222
III-3.2. Mise au point de la technique avec différentes protéines	223
III-3.2.1. gC	223
III-3.2.2. RANTES (9-68)	224
III-3.2.3. Le fragment α 3LG4/5 de la laminine-5	225
III-3.3. Alternative : élimination des billes, utilisation d'oligosaccharides définis	226
III-3.4. Application à gp120	230
DISCUSSION GENERALE	235
I- PRODUCTION ET PURIFICATION DE GP120	238
I-1. Choix du système d'expression	238
I-2. Choix de la séquence signal d'excrétion	242
I-3. Choix du type cellulaire	244
I-4. Optimisation des conditions de purification	245
II- ANALYSE FONCTIONNELLE DE GP120 SAUVAGE	247
III- ETUDE DU SITE CD4I	252

IV- CARACTERISATION DES DOMAINES D'INTERACTION AVEC L'HEPARINE	255
IV-1. Méthode des billes	255
IV-1.1. Méthodologie	255
IV-1.2. Limites et optimisation de la technique	257
IV-1.3. Etude des HBD de RANTES, gC et du fragment α 3LG4/5 de la laminine-5	258
IV-2. Etude des HBD en solution	260
IV-2.1. Méthodologie	260
IV-2.2. Etude des HBD de RANTES et gp120	261
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	265
ANNEXES	271

LISTE DES ABREVIATIONS

<p style="text-align: center;">A</p> <p>AAV : adenovirus associated virus ADN : acide désoxyribonucléique ANRS : agence nationale de recherches sur le SIDA ARN : acide ribonucléique ARNi : ANR interférence ARNm : ARN messenger AT-III : antithrombine III AZT : azidothymidine</p>	<p style="text-align: center;">F</p> <p>Fab: fragment antigen binding FDA : food and drug administration FGF: fibroblast growth factor FGFR: FGF receptor FITC: fluorescein isothiocyanate FRET : fluorescence. resonance energy transfert</p>
<p style="text-align: center;">B</p> <p>BCG : bacille de Calmette-Guérin BLTR : B4 leukotriene receptor</p>	<p style="text-align: center;">G</p> <p>GAG : glycosaminoglycane gag : group specific antigen GalCer : galactosyl ceramide Gal : galactose GalNAc : N-acétyl-D-galactosamine GlcA : acide D-glucuronique GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine GlcNS : N-acétyl-D-glucosamine sulfatée GNA : <i>Galanthus nivalis</i> agglutinin gp : glycoprotéine Gpc : glypican GPI : glycosylphosphatidylinositol</p>
<p style="text-align: center;">C</p> <p>CCR : CC-chemokine receptor CD (n°) : cluster of differentiation CD4i : CD4 induit CERMAV: centre d'étude et de recherche sur les macromolécules végétales CMH : complexe majeur d'histocompatibilité CMV : cytomégalovirus CPA : cellule présentatrice d'antigènes CS : chondroïtine sulfate CSPG : protéoglycane à chaînes de chondroïtine sulfate CXCR : CXC-chemokine receptor</p>	<p style="text-align: center;">H</p> <p>HA: acide hyaluronique HAART : highly active anti-retroviral therapy HBD: heparin binding domain HBV : virus de l'hépatite B HHA : <i>Hippeastrum hybrid</i> agglutinin Hp: héparine HS : héparane sulfate HS2ST : 2-O-sulfotransférase HSPG: protéoglycane à chaînes d'héparane sulfate HTLV : human T-cell leukemia virus</p>
<p style="text-align: center;">D</p> <p>DC : dendritic cell DC-SIGN : dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin DS : dermatane sulfate DSPG : protéoglycane à chaînes de dermatane sulfate</p>	<p style="text-align: center;">I</p> <p>ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1 IdoA : acide L-iduronique IFNγ : interféron gamma IgG : immunoglobuline G IL : interleukine INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse INT : intégrase INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse</p>
<p style="text-align: center;">E</p> <p>EGF : epidermal growth factor env : envelope ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay EXTL : Exostosin tumor-like</p>	<p style="text-align: center;">K</p> <p>kb : kilobase kDa : kilo Dalton KO: knock out KS : kératane sulfate KSPG : protéoglycane à chaînes de kératane sulfate</p>

<p>L</p> <p>LAV : lymphadenopathy associated virus LC : Langerhans cell LFA-1 : lymphocyte function-associated antigen-1 LMWH : low molecular weight heparin LTR : long terminal repeat</p>	<p>S</p> <p>sCD4 : CD4 soluble Sdc : syndécan SDF-1α : stromal derived factor SI : syncitium inducing SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise SNC : système nerveux central</p>
<p>M</p> <p>MCP : monocyte chemoattractant protein MIP : macrophage inflammatory protein MMP: matrix metalloproteinase MMR : macrophage mannose receptor</p>	<p>T</p> <p>Tat : transactivator TGF-β : Transforming growth factor beta TI : transcriptase inverse TNF-α : tumor necrosis factor-alpha</p>
<p>N</p> <p>NC : nucléocapside NDST: N-déacétylase/N-sulfotransférase Nef : negative regulation factor NF-κB : Nuclear Factor Kappa B NK : natural killer NSI : non-syncitium inducing</p>	<p>U</p> <p>UDA : <i>Urtica dioica</i> agglutinin</p>
<p>O</p> <p>OMS : organisation mondiale de la santé ONUSIDA : programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA</p>	<p>V</p> <p>VEGF : vascular endothelial growth factor VLP : virus-like particle vif : viral infectivity VIH : virus de l'immunodéficience humaine VIS : virus de l'immunodéficience simienne vpr : viral protein R vpu : viral protein U VS : virological synapse VSV : Vesicular stomatitis virus</p>
<p>P</p> <p>pb : paire de base PDGF : platelet-derived growth factor PDI : protein disulfide isomerase PF4 : platelet factor 4 PG : protéoglycane pol : polymérase PPS : pentosane polysulfate</p>	<p>X</p> <p>Xyl : xylose</p>
<p>R</p> <p>RANTES : regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted rev : regulator of viral expression RMN: résonance magnétique nucléaire</p>	

GLOSSAIRE

Cellule dendritique : cellule ramifiée, rencontrée souvent au niveau des muqueuses (rate et ganglions), impliquée dans la présentation des antigènes aux lymphocytes. Elle est issue, comme le macrophage, de la différenciation d'un monocyte circulant dans le sang.

Cellule de Langerhans : cellule présentatrice d'antigènes (CPA) présente dans l'épiderme, qui peut migrer vers les ganglions où elle devient une cellule dendritique.

Cellule NK (natural killer) : cellule qui, sans avoir subi de sensibilisation préalable, peut détruire des cellules porteuses d'anticorps en l'absence de complément.

Cytokines : ensemble de glycoprotéines solubles libérées par les cellules, agissant localement sur les cellules sécrétrices (action autocrine) ou sur celles du voisinage (action paracrine), et permettant la communication entre les cellules ainsi que leur activation vers un processus de prolifération ou une nouvelle aptitude fonctionnelle. Certaines d'entre elles, comme l'IL-1 et les TNF, peuvent agir à distance (action endocrine), en particulier au cours de la réponse inflammatoire, sur le système nerveux, la moelle osseuse, le foie, modifiant le métabolisme général de l'organisme.

Leucocytes : nom donné aux différents globules blancs présents dans le sang. Parmi les leucocytes, on trouve les polynucléaires, les lymphocytes et les monocytes.

Lymphocytes : type de globules blancs, de petite taille, à un seul noyau, produits par les tissus lymphatiques et spécialisés dans la défense immunitaire de l'organisme. Il existe deux sortes de lymphocytes, les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire (réponse des cellules aux antigènes) et les lymphocytes B, qui, eux, sont essentiellement producteurs d'anticorps, donc associés à l'immunité humorale (déclenchement des sécrétions des différentes cytokines).

Lymphocytes T : cellules de l'immunité qui ont subi une maturation au niveau du thymus, d'où leur appellation. Il en existe deux types : les lymphocytes T CD4 (qui expriment le récepteur CD4), ou lymphocytes T auxiliaires, sont les coordinateurs des différentes réactions immunitaires, ils sont la cible principale du VIH qui les détruit. Les lymphocytes T CD8, ou lymphocytes T cytotoxiques, agissent en éliminant les cellules malades (cellules infectées, tumorales...). L'ensemble des lymphocytes T CD4 est constitué de cellules naïves et de cellules mémoires.

Lymphocytes naïfs : cellules qui n'ont pas encore rencontré l'antigène qui les infectera. Elles deviendront alors des cellules actives qui se multiplient rapidement, produisant une réaction immunitaire spécifique contre l'antigène rencontré. Lorsque l'antigène disparaît, par destruction de celui-ci, les lymphocytes T CD4 actifs meurent et seul un petit nombre, devenu inactif subsistera pour constituer les lymphocytes mémoires.

Lymphocytes mémoires : lymphocytes T qui apparaissent après une exposition à certains antigènes et qui peuvent circuler dans le sang très longtemps. En cas de nouvelle infection par ces mêmes antigènes, ils réagissent plus rapidement et avec une meilleure efficacité pour lutter contre le pathogène. Dans le cas d'une infection par le VIH, ils peuvent intégrer le génome viral dans leur ADN et constituer une réserve de cellules capables de produire le virus en cas de réactivation. En présence d'un traitement antirétroviral actif, leur nombre ne diminue que très lentement, d'où la persistance de l'infection au cours du temps.

Macrophages : cellules qui détruisent des pathogènes et sécrètent des cytokines et des médiateurs de l'inflammation, deux fonctions associées à la réponse innée. Ces cellules participent également à l'immunité spécifique en présentant des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Complètement différenciés, les macrophages proviennent des monocytes qui circulent dans les systèmes sanguin et lymphatique. Lorsque ces derniers s'activent (sous l'effet des cytokines ou autres agents pro-inflammatoires), ils migrent vers les tissus inflammés où ils se différencient en macrophages. Après avoir phagocyté des antigènes, les macrophages empruntent la circulation et présentent les antigènes aux lymphocytes T CD4+ dans les organes lymphoïdes secondaires.

Monocytes : cellules de l'immunité (globules blancs) circulant dans le sang. En présence de certaines cytokines, les monocytes se différencient en cellules dendritiques ou en macrophages capables de franchir la paroi des vaisseaux sanguins et de migrer vers le lieu d'une infection.

Sélectines : protéines d'adhérence spécialisées dans les interactions entre leucocytes et cellules de l'endothélium vasculaire. Les sélectines ont un domaine extracellulaire semblable aux lectines : elles reconnaissent spécifiquement certains sucres. On a identifié :

Sur les leucocytes : -la sélectine L (L pour leucocyte)
Sur les cellules endothéliales : -la sélectine E (E pour endothélium)
 -la sélectine P (P pour plaquette)

Ces trois sélectines permettent l'adhésion de certains leucocytes (polynucléaires, monocytes) à l'endothélium vasculaire, prélude à leur diapédèse, qui les conduira vers le site inflammatoire.

Les sélectines sont exprimées quand les cellules sont activées par certaines cytokines (TNF α , IL-1, IFN γ).

Syncytium (pluriel : syncytia) : cellule contenant plusieurs noyaux, formée par l'agglomération et la fusion de plusieurs cellules infectées.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1 : adultes et enfants vivant avec le VIH – Estimations en 2006
- Figure 2 : structure du VIH-1
- Figure 3 : organisation génomique du VIH
- Figure 4 : cycle de réplication du VIH-1
- Figure 5 : la neuroinvasion du VIH
- Figure 6 : stratégies vaccinales développées contre le VIH
- Figure 7 : représentation schématique des différents domaines du complexe Env
- Figure 8 : structure de gp120
- Figure 9 : modèle d'oligomérisation de gp120
- Figure 10 : structure des N-glycanes généralement observés dans une glycoprotéine
- Figure 11 : conformations de gp41 au cours de l'entrée du virus dans la cellule
- Figure 12 : mécanisme de l'entrée virale
- Figure 13 : structure du récepteur CD4
- Figure 14 : schéma de l'interaction gp120/CD4
- Figure 15 : structure de CCR5
- Figure 16 : les récepteurs du VIH-1
- Figure 17 : représentation schématique des différents syndécans
- Figure 18 : motif disaccharidique de base des héparanes sulfate
- Figure 19 : étapes de la biosynthèse des héparanes sulfate
- Figure 20 : organisation moléculaire des HS
- Figure 21 : motif de liaison à l'antithrombine III
- Figure 22 : représentation schématique du complexe ternaire entre l'héparine, l'AT-III et les protéases à sérine
- Figure 23 : mécanisme d'action du Fondaparinux
- Figure 24 : déterminants structuraux des disaccharides reconnus par les HS3ST-1 et -3
- Figure 25 : adsorption de virus de tropisme viral différent sur une surface d'héparine
- Figure 26 : rôles des héparanes sulfate dans l'infection *en trans* de cellules
- Figure 27 : analyse de l'interaction héparine/gp120 par le système BIAcore
- Figure 28 : étude de l'interaction héparine/gp120 par modélisation moléculaire
- Figure 29 : inhibition de l'interaction gp120/CD4/17b par l'héparine
- Figure 30 : schéma des étapes de clonage réalisées afin de générer pMT-BiP-gp120
- Figure 31 : schéma des étapes de clonage réalisées pour créer le bacmide recombinant
- Figure 32 : principe de l'amplification avec les amorces M13
- Figure 33 : schéma des étapes de culture cellulaire réalisées pour produire gp120
- Figure 34 : carte de restriction par PstI du plasmide pMT/BiP/V5/HisA-gp120
- Figure 35 : test d'expression de gp120 dans les cellules S2
- Figure 36 : optimisation des conditions de production de gp120 dans les cellules S2
- Figure 37 : vérification de la présence du gène codant pour gp120 dans pFastBac
- Figure 38 : vérification par PCR de la présence des éléments transposables de pFastBac dans trois bacmides
- Figure 39 : vérification de la présence de la mutation K421S dans pNT-Bac-gp120
- Figure 40 : vérification par PCR de la présence des éléments transposables de pNT-Bac dans deux bacmides
- Figure 41 : test cinétique d'expression de gp120 dans des cellules HF
- Figure 42 : vérification des glycosylations de gp120 produite en cellules d'insectes
- Figure 43 : test cinétique d'expression de gp120 *via* le système baculovirus, dans différents types cellulaires

Figure 44 : test cinétique d'expression de gp120 dans des cellules Sf21 cultivées en monocouche ou en suspension

Figure 45 : chromatogramme correspondant à l'étape de purification sur une résine échangeuse de cations

Figure 46 : analyse sur un gel SDS-PAGE des fractions recueillies au cours de l'étape de purification sur la résine échangeuse de cations

Figure 47 : étape de purification de gp120 sur une résine de lentil-lectine.

Figure 48 : étape de purification de gp120 par chromatographie d'exclusion

Figure 49 : récapitulatif des étapes de purification/concentration de gp120

Figure 50 : purification des formes mutantes de gp120

Figure 51 : principe de l'appareil BIAcore

Figure 52 : sensorgramme type obtenu avec le BIAcore

Figure 53 : analyse SPR de l'interaction gp120/CD4

Figure 54 : analyse SPR de l'interaction gp120/17b en présence ou non de sCD4

Figure 55 : analyse SPR de l'interaction gp120/héparine

Figure 56 : étude de l'affinité de gp120 pour l'héparine

Figure 57 : inhibition de l'interaction 12G5-FITC/CXCR4 par SDF-1 α ou gp120

Figure 58 : principe de la détection du calcium développé par Euroscreen

Figure 59 : les cellules CHO expriment CXCR4 et des HS

Figure 60 : SDF-1 α (300 nM) induit la voie de signalisation du calcium dans les cellules traitées ou non à l'héparinase

Figure 61 : la libération du calcium intracellulaire induite par la fixation de SDF-1 α sur CXCR4 est dose-dépendante

Figure 62 : mobilisation du calcium intracellulaire par des complexes gp120/CD4

Figure 63 : chimiotaxie de cellules A3.01 induite par SDF-1 α ou gp120

Figure 64 : modélisation moléculaire de la protéine gp120

Figure 65 : analyse SPR de l'interaction des formes mutées de gp120 avec CD4

Figure 66 : analyse SPR de l'interaction CD4i/17b pour les formes mutées de gp120

Figure 67 : étude de l'affinité de gp120 pour l'héparine

Figure 68 : analyse SPR des formes mutées de gp120 en interaction avec l'héparine

Figure 69 : analyse SPR de l'interaction gp120/héparine en présence de CD4

Figure 70 : l'héparine inhibe l'interaction CD4i/17b

Figure 71 : analyse SPR de l'implication des acides aminés du site CD4i dans l'interaction avec l'héparine

Figure 72 : des oligosaccharides de différentes tailles inhibent l'interaction CD4i/17b

Figure 73 : méthode d'étude des interactions « protéines-oligosaccharides »

Figure 74 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de la protéine gC

Figure 75 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de RANTES (9-68)

Figure 76 : analyse des HBD du fragment α 3LG4/5 de la laminine

Figure 77 : analyse de la fixation de RANTES (9-68) à l'héparine activée

Figure 78 : profil d'élution des complexes héparine/RANTES (9-68)

Figure 79 : analyse des fractions récoltées lors de la purification sur résine de DEAE

Figure 80 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de RANTES (9-68)

Figure 81 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de gp120

Figure 82 : analyse des HBD de gp120 préincubée avec CD4

Figure 83 : comparaison des voies de glycosylation chez les insectes et les mammifères

Figure 84 : voies de signalisation et régulation de CXCR4

Figure 85 : Concept de la molécule hybride CD4-HS brevetée

Tableau I : fonctions des protéines de régulation du VIH
Tableau II : nomenclature des souches de VIH en fonction de leur tropisme viral
Tableau III : les différents inhibiteurs de l'entrée virale
Tableau IV : les corécepteurs utilisés par le VIH-1, le VIH-2 ou le SIV
Tableau V : les récepteurs cellulaires impliqués dans la fixation du VIH
Tableau VI : exemples de pathogènes (bactéries, parasites, virus) utilisant les HS
Tableau VII : tableau des milieux de culture cellulaire utilisés
Tableau VIII : amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée
Tableau IX : récapitulatif des conditions expérimentales utilisées
Tableau X : calcul du titre viral des différents stocks de virus

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

I-1. Historique et bilan de l'infection à VIH

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) appartient à la famille des rétrovirus, des virus enveloppés qui possèdent un génome à ARN monocaténaire diploïde. Leur particularité est de posséder une "transcriptase inverse", enzyme qui permet la transcription de l'ARN viral en molécule d'ADN "complémentaire" bicaténaire, capable de s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte.

I-1.1. Découverte des rétrovirus

Les premiers rétrovirus ont été observés au début du siècle dernier : le virus de la leucémie aviaire¹ en 1908 et le virus du sarcome de Rous² en 1911. Vers la fin des années 1950, des rétrovirus provoquant des tumeurs chez les mammifères, tels que le virus de la leucémie murine de Moloney (MuLV), ont été observés³. Puis, en 1980, le premier rétrovirus humain⁴ (HTLV-I pour *Human T-Cell Leukemia Virus I*) a été découvert, suivi, en 1983, par la découverte du VIH^{5,6}.

I-1.2. Découverte du VIH

En 1981, le CDC (*Center of Disease Control*) d'Atlanta, qui centralise les informations sur la situation des maladies infectieuses, signale un accroissement récent du nombre de cas de pneumonies à *Pneumocystis carinii* et de sarcomes de Kaposi, affections rares touchant les sujets immunodéprimés. Les premiers cas sont recensés chez des sujets homosexuels. Les mêmes symptômes sont ensuite détectés chez des toxicomanes et des personnes transfusées, puis chez des hommes hétérosexuels et des femmes d'Afrique centrale. Le CDC postule donc l'existence d'un nouveau syndrome dont la particularité est l'acquisition d'un état immunodéprimé, caractérisé par la chute du nombre de lymphocytes T. Cet ensemble de maladies dû à l'inefficacité du système immunitaire est appelé SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise).

La transmission par voies sexuelle et sanguine, analogue à la transmission de l'hépatite B, rend très probable l'origine virale de la maladie. Différents virus sont isolés à partir de patients immunodéficients. Tout d'abord, le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'hépatite B (HBV) et le HTLV. Mais, ces virus sont en fait responsables d'infections

¹ Ellerman, V. and Bang, O. (1908) *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig* **46**, 595-609

² Rous, P. (1911) *J Exp Med* **13**, 397-411

³ Gross, L. (1957) *Proc Soc Exp Biol Med* **94** (4), 767-771

⁴ Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Reitz, M. S., Kalyanaraman, V. S. and Gallo, R. C. (1981) *Nature* **294** (5838), 268-271

⁵ Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983) *Science* **220** (4599), 868-871

⁶ Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. and Popovic, M. (1983) *Science* **220** (4599), 865-867

opportunistes, conséquence et non cause de l'immunodéficience. En 1983, un nouveau rétrovirus humain est isolé, par le groupe de Luc Montagnier⁷, à partir de lymphocytes du sang prélevés chez un patient atteint du SIDA. Après sa découverte, le virus porte divers noms : LAV-1 pour Lymphadenopathy Associated Virus⁷ et HTLV-III pour Human T-Lymphotropic Virus⁸. Le comité international de taxonomie des virus introduit, en 1986, le terme actuel de Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

I-1.3. Origines et diversité du VIH

Il existe deux types de VIH : le VIH-1, à l'origine du SIDA et le VIH-2, responsable d'un syndrome d'immunodéficience se développant lentement^{9,10}. Ils se différencient par leur origine géographique, l'organisation de leur génome et la relation phylogénétique qu'ils ont avec les autres lentivirus de primates dont ils sont tous les deux issus. Le VIH-1 se caractérise par une grande variabilité génétique. Les souches de virus peuvent être classées selon trois groupes :

- le groupe M (*Main*), majoritaire, regroupe onze sous-types de VIH (A à K) classés en fonction de leurs séquences virales¹¹, le B étant le plus répandu en France et le C prédominant au niveau mondial ;
- le groupe O (*Outlier*), très rare, retrouvé au Gabon et au Cameroun ;
- le groupe N (Non-M et Non-O), également rare, identifié au Cameroun.

Antigéniquement distinct du VIH-1, mais également moins pathogène, le VIH-2 a une diffusion actuellement restreinte à l'Afrique de l'Ouest.

L'apparition des souches de VIH découle probablement d'une transmission inter-espèce entre des hommes et des primates infectés par le Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS). Plusieurs modes de transmission ont été proposés, dont une exposition directe des hommes à du sang animal contaminé lors de chasses de primates ou de consommation de viande contaminée crue. L'hypothèse d'une transmission à l'Homme au cours d'une campagne massive de vaccination contre la poliomyélite, dans les années 1950, au Congo Belge, au Rwanda et au Burundi a également été avancée¹². Certaines équipes de

⁷ Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983) *Science* **220** (4599), 868-871

⁸ Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. and Popovic, M. (1983) *Science* **220** (4599), 865-867

⁹ Blattner, W., Gallo, R. C. and Temin, H. M. (1988) *Science* **241** (4865), 515-516

¹⁰ Weiss, R. A. (1993) *Science* **260** (5112), 1273-1279

¹¹ McCutchan, F. E., Carr, J. K., Bajani, M., Sanders-Buell, E., Harry, T. O., Stoeckli, T. C., Robbins, K. E., Gashau, W., Nasidi, A., Janssens, W. and Kalish, M. L. (1999) *Virology* **254** (2), 226-234

¹² Hooper, C. (1998) *N Engl J Med* **339** (27), 2027-2028

recherche ont, depuis, estimé l'apparition des premières souches du VIH (groupe M) au début des années 1930, réfutant ainsi la thèse de la transmission par les vaccins¹³.

I-1.4. Epidémiologie

Des études réalisées en 2006 par l'OMS et l'ONUSIDA révèlent qu'environ 39,5 millions de personnes sont infectées par le VIH à travers les cinq continents et que 20 millions en sont déjà décédées (figure 1). Le nombre de nouveaux cas d'infection s'élève à 12000 par jour dans le monde, dont 95% dans les pays à faibles et moyens revenus.

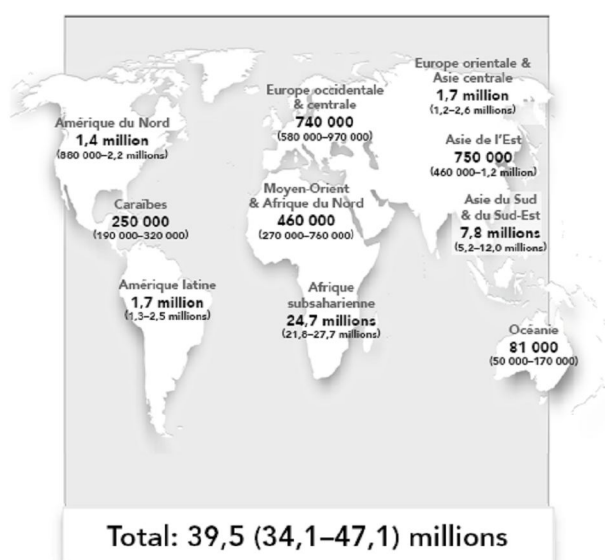


Figure 1 : adultes et enfants vivant avec le VIH – Estimations en 2006

Source : ONUSIDA et OMS, le point sur l'épidémie de SIDA - Décembre 2006

L'Afrique est de loin le continent le plus touché par l'épidémie, puisque 65% des nouveaux cas en 2006 y ont été recensés. En Afrique subsaharienne, environ 24,7 millions de personnes sont séropositives et, dans certains pays, l'épidémie atteint des niveaux considérables : 33,4% de la population au Swaziland, 20 à 24% au Zimbabwe, au Botswana, au Lesotho ou en Namibie.

En Asie, l'épidémie continue de s'étendre et le nombre de personnes séropositives est estimé à 8,6 millions. En Chine, la transmission du virus se fait principalement par voie sanguine, au cours d'injections de drogues (44% des personnes contaminées) alors qu'en Inde, la majorité des infections à VIH est due à des rapports hétérosexuels non protégés.

L'Europe de l'Est est la région du monde où l'incidence de l'infection augmente le

¹³ Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S. and Bhattacharya, T. (2000) *Science* **288** (5472), 1789-1796

plus vite actuellement : le nombre de personnes séropositives a été multiplié par 20 en moins d'une décennie. Près de 1,7 millions de personnes y sont contaminées, principalement par voie sanguine (63%), du fait du nombre élevé de consommateurs de drogues.

Dans les pays à revenus élevés (Amérique du Nord, Europe occidentale, Océanie), l'infection est loin d'être aussi étendue que dans les pays cités précédemment. Près de 65000 personnes y ont été infectées par le VIH en 2006, portant à 2,1 millions le nombre de personnes séropositives. La transmission sexuelle (homo et hétérosexuelle) du VIH représente une part toujours plus grande des nouvelles infections, les minorités ethniques étant particulièrement exposées. En France, le nombre de nouveaux cas de SIDA déclarés en 2005 était de 1200, avec une diminution de 5% par an depuis 1999, et environ 400 décès (source Institut de Veille Sanitaire-InVS). Depuis le début de l'épidémie, 34600 personnes sont décédées et 26600 personnes vivent avec le SIDA. Les prévalences les plus fortes sont observées en Guyane, en région Ile-de-France, en Guadeloupe et en Martinique.

I-2. Le virus de l'immunodéficience humaine

I-2.1. La famille des rétrovirus

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus. Sur la base de critères de pathogénicité, on distingue trois sous-familles.

I-2.1.1. Les Oncovirus

Les *Oncovirinae* représentent la sous-famille majoritaire. Ce type de virus a été observé chez les insectes, les sangsues, les reptiles, les oiseaux et les mammifères. Les Oncovirus peuvent induire les tumeurs les plus variées : ils sont associés au développement de sarcomes (tumeurs du tissu conjonctif), de carcinomes (tumeurs des tissus épithéliaux), de lymphomes et de leucémies. Ce dernier type de tumeur est le plus fréquent dans la pathologie rétrovirale. Le virus HTLV-1, entre autres, appartient à cette sous-famille.

I-2.1.2. Les Spumavirus

Ce sont des virus « non pathogènes ». Ces virus ont été découverts par hasard au début des années 1950 chez plusieurs espèces animales (singes, bovins, chats, hamsters) où ils provoquent des infections inapparentes. Ils ont également été isolés chez l'Homme (en 1970). Les cellules infectées *in vitro* présentent des lésions qui ressemblent à de l'écume (« *spuma* » signifie mousse).

I-2.1.3. Les Lentivirus

Ce sont des virus cytopathogènes. Ces virus ont d'abord été isolés chez l'animal et sont responsables de maladies à évolution lente (*lentus* = lent). C'est à cette sous-famille qu'appartiennent les VIH-1 et VIH-2.

Les lentivirus infectent principalement les cellules du système immunitaire (macrophages et lymphocytes T CD4+). Par conséquent, les infections lentivirales résistent au système immunitaire et induisent généralement des immunodéficiences sur des périodes relativement longues. Un autre caractère distinctif de cette sous-famille, particulièrement pour le VIH, consiste en leur capacité à infecter des cellules quiescentes et/ou en différenciation terminale. Leurs génomes contiennent l'information pour tous les gènes essentiels et accessoires nécessaires à l'expression des protéines virales dans les cellules infectées. Les lentivirus ont aussi la capacité de réduire l'expression de leurs protéines chez les cellules infectées et d'établir un état de latence. Ce dernier peut persister sur une longue période jusqu'à la réactivation du virus lors d'une réponse cellulaire. L'existence de cellules réservoirs (infectées de façon latente) est un des principaux obstacles à l'éradication du VIH chez les patients sous thérapie antirétrovirale (cf I-3.1.4.).

I-2.2. Caractéristiques du virus

I-2.2.1. Organisation de la particule virale

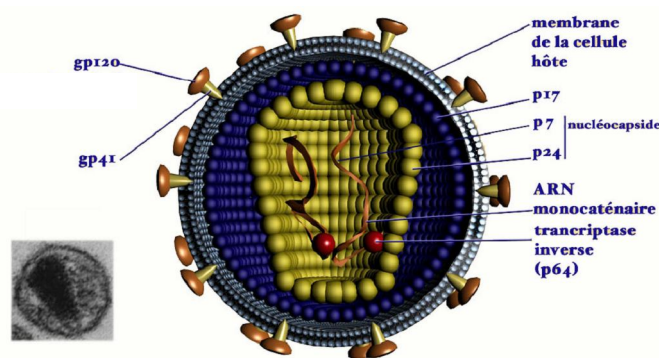


Figure 2 : structure du VIH-1

En insert en bas à gauche : la structure du virus vue par microscopie électronique.
Source : <http://imagessvt.free.fr/dessins/dessins2.html>

Le VIH (figure 2) possède une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique, dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte infectée. La surface de cette enveloppe est recouverte de complexes protéiques, responsables de l'attachement du virus sur les cellules hôtes. Il s'agit de spicules formés par l'association non covalente de deux glycoprotéines,

gp120 et gp41, présentes sous forme de trimères¹⁴. La protéine gp120 se fixe aux récepteurs cellulaires tandis que gp41 est responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire. Ces deux protéines sont codées par le gène *env*, sous la forme de gp160, une protéine précurseur qui sera glycosylée puis clivée en gp41 et gp120. La face interne de l'enveloppe est tapissée d'une couche de 7 nm de p17, une protéine codée par le gène *gag* et constituant la matrice.

Le cœur du virion renferme deux copies d'ARN viral, protégées par une capside formée par l'assemblage des protéines p24, autre produit du gène *gag*. Associées aux molécules d'ARN, on trouve de nombreuses protéines virales impliquées dans le processus d'encapsidation du matériel génétique au cours du cycle viral (p7, par exemple) ou nécessaires à l'infection virale d'une cellule hôte (par exemple la transcriptase inverse, l'intégrase, la protéine virale R). Une cinquantaine de molécules de chaque enzyme sont réunies dans un virion.

I-2.2.2. Organisation du génome

Le génome, d'une taille d'environ 9200 pb, code pour les protéines virales et est encadré par deux régions non codantes (figure 3).

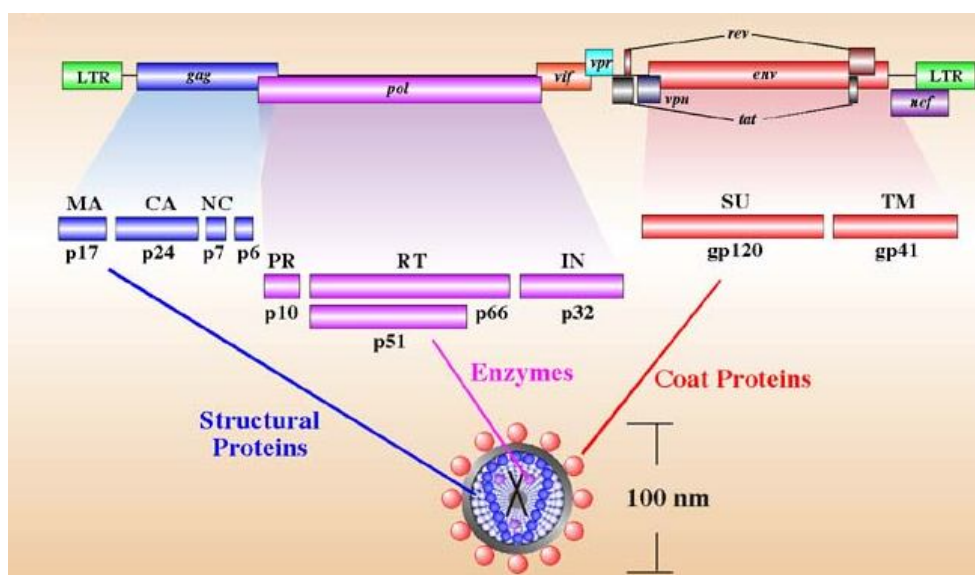


Figure 3 : organisation génomique du VIH

Le génome du VIH est constitué de 3 gènes principaux, *gag*, *pol* et *env*, qui codent respectivement pour des protéines de la capside, des enzymes virales et des protéines d'enveloppe. Il existe également plusieurs gènes codant pour des protéines régulatrices. L'ensemble de ces gènes est encadré par deux régions LTR non codantes. Légende : MA : matrice, CA : capside, NC : nucléocapside, PR : protéase, RT : transcriptase inverse, IN : intégrase, SU : protéine de surface, TM : protéine transmembranaire

Source : Stanford University : <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html#references>

¹⁴ Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A. and Roux, K. H. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (26), 15812-15817

De 5' en 3', on trouve :

- la région non codante 5' (5' LTR pour Long Terminal Repeat),
- le gène *gag* (pour *group specific antigens*), qui code pour une polyprotéine ultérieurement clivée en protéines (de capsid, de nucléocapsid et de matrice) par la protéase virale,
- le gène *pol* (pour polymérase), qui code pour les trois enzymes : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase,
- le gène *env* (pour enveloppe), qui code pour gp160. De part et d'autre du gène *env*, on trouve des gènes de régulation,
- La région non codante 3'.

Les régions non codantes sont les régions stratégiques du virus. On y trouve des signaux de régulation de la transcription et de la traduction, des séquences d'amorçage de la réplication, des signaux pour l'intégration et pour l'encapsidation.

Outre les gènes *gag*, *pol* et *env*, le VIH possède six gènes codant pour de petites protéines régulatrices (figure 3 et tableau I). On peut notamment mentionner Tat et Rev, qui assurent des fonctions régulatrices indispensables à la réplication du virus. Les quatre autres protéines Nef, Vif, Vpr (VIH-1) et Vpu (VIH-2) ne sont pas nécessaires à la réplication virale dans les lymphocytes T et sont considérées comme des protéines non essentielles, mais confèrent au virus son degré de virulence.

Gènes	Fonctions
<i>tat</i> (<i>transactivator</i>)	Régulation positive de la transcription
<i>rev</i> (<i>regulator of viral expression</i>)	Export des transcrits non épissés hors du noyau
<i>vif</i> (<i>viral infectivity</i>)	Inhibition de la désamination de l'ADN viral en liant la protéine antirétrovirale APOBEC3G
<i>vpr</i> (<i>viral protein R</i>)	Transport de l'ADN au noyau, augmentation de la production virale, contrôle du cycle cellulaire
<i>vpu</i> (<i>viral protein U</i>)	Réduction de l'expression de CD4
<i>nef</i> (<i>negative regulation factor</i>)	Augmentation de l'infectivité, réduction de l'expression de CD4

Tableau I : fonctions des protéines de régulation du VIH

I-2.2.3. Le cycle viral

Le cycle de réplication du VIH (figure 4) est similaire à celui des autres rétrovirus et débute par l'attachement du virus sur la cellule cible.

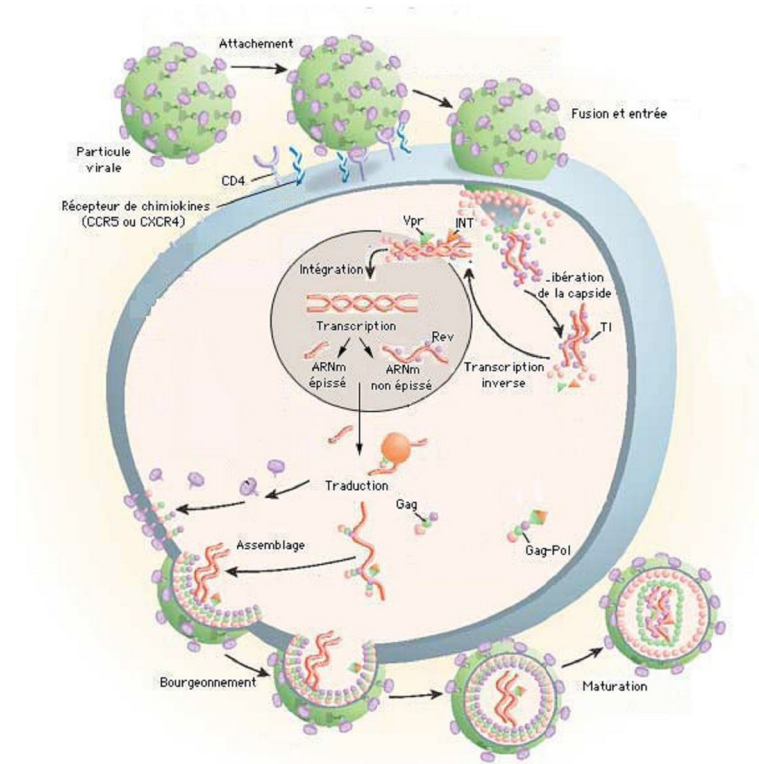


Figure 4 : cycle de réplication du VIH-1¹⁵

Le virus s'attache à la cellule *via* des interactions entre gp120 et les récepteurs cellulaires CD4 et CXCR4 ou CCR5. La fusion des membranes virales et cellulaires est initiée par une réorganisation de gp41 ; le matériel génétique viral est alors introduit dans la cellule et rétrotranscrit par la transcriptase inverse. L'ADN ainsi synthétisé est transporté vers le noyau et intégré dans l'ADN cellulaire, où il est transcrit et traduit, au même titre que le génome de la cellule. Les nouveaux virions sont assemblés au niveau de la membrane cellulaire d'où ils bourgeonnent.

Légende: INT: Intégrase, TI: Transcriptase Inverse

Dans un premier temps, la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 s'associe avec le récepteur CD4, à la surface des cellules. Cette interaction provoque un changement conformationnel de gp120 qui aboutit à la formation et/ou l'exposition d'un épitope particulier, CD4i (CD4 induit). Ce site est reconnu par les chimiorécepteurs CCR5 ou CXCR4 qui jouent le rôle de corécepteurs de gp120 à la surface cellulaire^{16,17,18,19}. Cette deuxième interaction entraîne la modification de la structure de gp41 et permet au peptide hydrophobe "fusogénique" se situant à son extrémité N-terminale de se déployer et de pénétrer dans la

¹⁵ Pomerantz, R. J. and Horn, D. L. (2003) *Nat Med* **9** (7), 867-873

¹⁶ Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. and Doms, R. W. (1996) *Cell* **85** (7), 1149-1158

¹⁷ Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. and Berger, E. A. (1996) *Science* **272** (5263), 872-877

¹⁸ Clapham, P. R. and Weiss, R. A. (1997) *Nature* **388** (6639), 230-231

¹⁹ Moore, J. P., Trkola, A. and Dragic, T. (1997) *Curr Opin Immunol* **9** (4), 551-562

bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Un dernier changement de conformation de gp41 permet le rapprochement et la fusion des deux membranes, conduisant au transfert de la capsid virale dans la cellule cible (cf II-2.).

Une fois dans la cellule hôte, la capsid se désagrège et libère l'ARN viral. La transcriptase inverse crée alors une copie ADN à partir de la matrice ARN, puis hydrolyse le brin d'ARN^{20,21}. La transcription inverse suit un mécanisme très complexe qui conduit à la création de séquences particulières au niveau des LTR. En 5', le LTR est un promoteur puissant de la transcription. En 3', il fournit le signal de coupure qui précède la polyadénylation ; c'est aussi un promoteur potentiellement capable d'activer un gène cellulaire situé à proximité. A ce stade, l'ADN proviral n'exprime aucune protéine virale, ce qui permet au virus de ne pas être reconnu par les défenses immunitaires. Contrairement à certains autres virus, le VIH peut également transférer des gènes dans le noyau de cellules qui ne sont pas en division, ce qui le rend beaucoup plus efficace en terme de pouvoir infectieux.

L'ADN proviral forme un complexe de préintégration et est transporté, conjointement à l'intégrase virale fixée au niveau des LTR, dans le noyau, où il se circularise²². L'intégrase coupe alors les deux brins de l'ADN cellulaire pour introduire l'ADN viral. L'intégration semble pouvoir se faire dans de multiples sites de l'ADN cellulaire. Un seul et unique polypeptide est ainsi synthétisé ; il sera clivé par une protéase virale en protéines ayant chacune une fonction particulière. La transcription du provirus intégré dans le génome cellulaire dépend du niveau d'activation de la cellule hôte. Dans les cellules quiescentes, il n'y a pas transcription du génome viral. L'ADN est alors transmis aux cellules descendantes à chaque mitose, les gènes du VIH étant temporairement endormis, lui conférant ainsi une invisibilité antigénique : c'est la latence. A l'opposé, toute stimulation conduisant à l'activation de la cellule va induire la transcription du génome viral par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Lors de l'activation de la cellule, les facteurs de transcription cellulaires nécessaires (tels que NF-κB) vont être disponibles et pourront être recrutés au niveau du promoteur viral. La machinerie de la cellule hôte et celle du virus sont toutes les deux nécessaires pour la transcription des gènes viraux. La transcription commence au niveau de la région R du LTR en 5' et se termine après la région R du LTR en 3' par un signal de

²⁰ Goff, S. P. (1990) *Cancer Cells* **2** (6), 172-178

²¹ Katz, R. A. and Skalka, A. M. (1994) *Annu Rev Biochem* **63**, 133-173

²² Depienne, C., Mousnier, A., Leh, H., Le Rouzic, E., Dormont, D., Benichou, S. and Dargemont, C. (2001) *J Biol Chem* **276** (21), 18102-18107

polyadénylation. Les transcrits viraux ont donc la même structure que tout ARN messenger eucaryote (ARNm), avec une coiffe à l'extrémité 5' et une queue de polyadénines (poly A) à l'extrémité 3'. De ce fait, ils sont épissés par les enzymes cellulaires.

Après la transcription, les ARNm viraux sont traduits, permettant la production des protéines de l'enveloppe, des éléments structurels du virion et des enzymes virales (transcriptase inverse, protéase et intégrase).

Les protéines virales s'assemblent ensuite au niveau de la membrane cellulaire pour former une particule virale immature qui bourgeonne à partir de la cellule infectée. Le gène *gag*²³ porte les informations nécessaires à l'assemblage et au bourgeonnement des virions. Il code pour une polyprotéine de 55 kDa (le précurseur Gag) qui, au cours de la maturation du virus, est clivée en quatre protéines par la protéase : p17 (matrice), p24 (capside), p7 (nucléocapside) et p6. Le seul élément nécessaire au bourgeonnement semble être la protéine p6. En effet, des cellules exprimant uniquement cette protéine sont capables de produire des vésicules (appelées particules pseudo-virales ou VLP pour *Virus-Like Particles*) de la taille des particules virales immatures^{24,25}. La protéine p6 colocalise avec l'actine, sur la face interne de la membrane cellulaire²⁶. Pour initier le bourgeonnement, p6 recrute diverses protéines cellulaires, dont Tsg101²⁷ et CDC42²⁸ qui joue un rôle dans la polymérisation de l'actine. Le virus emporte également avec lui une panoplie de composants cellulaires tels que des protéines du cytosquelette²⁹ (actine, ezrine, moesine, cofiline), du Staufen³⁰, de la cyclophiline A³¹, de l'APOBEC3G³² et des complexes ESCRT-1³³. D'autres protéines sont incorporées dans l'enveloppe virale : les molécules du CMH-I et II représentent près de 20% des protéines retrouvées sur l'enveloppe du VIH-1³⁴. Certaines souches présentent également la molécule ICAM-1³⁵.

²³ Freed, E. O. (1998) *Virology* **251** (1), 1-15

²⁴ Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. and De Wilde, M. (1989) *Cell* **59** (1), 103-112

²⁵ Shioda, T. and Shibuta, H. (1990) *Virology* **175** (1), 139-148

²⁶ Rey, O., Canon, J. and Krogstad, P. (1996) *Virology* **220** (2), 530-534

²⁷ Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., Myszk, D. G. and Sundquist, W. I. (2001) *Cell* **107** (1), 55-65

²⁸ Audoly, G., Popoff, M. R. and Gluschankof, P. (2005) *Retrovirology* **2**, 48

²⁹ Ott, D. E., Coren, L. V., Johnson, D. G., Kane, B. P., Sowder, R. C., 2nd, Kim, Y. D., Fisher, R. J., Zhou, X. Z., Lu, K. P. and Henderson, L. E. (2000) *Virology* **266** (1), 42-51

³⁰ Chatel-Chaix, L., Clement, J. F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L. and Mouland, A. J. (2004) *Mol Cell Biol* **24** (7), 2637-2648

³¹ Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. and Gottlinger, H. G. (1994) *Nature* **372** (6504), 363-365

³² Douaisi, M., Dussart, S., Courcou, M., Bessou, G., Vigne, R. and Decroly, E. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **321** (3), 566-573

³³ Stuchell, M. D., Garrus, J. E., Muller, B., Stray, K. M., Ghaffarian, S., McKinnon, R., Krausslich, H. G., Morham, S. G. and Sundquist, W. I. (2004) *J Biol Chem* **279** (34), 36059-36071

³⁴ Henderson, L. E., Sowder, R., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Arthur, L. O., Robey, W. G. and Fischinger, P. J. (1987) *J Virol* **61** (2), 629-632

³⁵ Bounou, S., Leclerc, J. E. and Tremblay, M. J. (2002) *J Virol* **76** (3), 1004-1014

I-2.3. Variabilité du virus

I-2.3.1. Mécanismes engendrant la variabilité

Tous les gènes du VIH-1 sont variables, les gènes *gag* et *pol* étant les plus conservés. Le gène *env* est, quant à lui, hypervariable. Cette variabilité génétique, qui se traduit par une diversité antigénique élevée du virus, est liée à plusieurs mécanismes :

- l'absence d'activité correctrice de la transcriptase inverse, induisant la génération d'erreurs à un taux d'environ $3,5 \cdot 10^{-5}$ erreurs par base et par cycle réplcatif³⁶. Ainsi, toute erreur d'incorporation de nucléotides dans la synthèse du brin d'ADN est fixée de manière définitive³⁷.
- la recombinaison entre les génomes de deux virus distincts^{38,39}. Les cellules pouvant être infectées par plusieurs virus, les génomes ARN des différents virus peuvent s'associer dans la même particule au moment du bourgeonnement⁴⁰. Après infection d'une nouvelle cellule, ils peuvent alors recombiner au moment de la transcription inverse. Cette propriété explique la possibilité d'apparition de résistances à certains traitements qui seraient moins fréquentes dans le cadre de polythérapies.

La variabilité contribue à la génération de variants viraux intra-individuels, mais également inter-individuels, plus éloignés génétiquement. Ainsi, les souches du VIH-1, isolées à travers le monde, sont continuellement caractérisées en fonction de leur homologie de séquence et peuvent être différenciées en 3 groupes M, O et N (cf I-1.3.).

I-2.3.2. Conséquences de la variabilité : le tropisme viral

❖ Définition et nomenclature

La capacité du VIH à infecter différentes populations de cellules est connue sous le nom de « tropisme viral ». Les corécepteurs CCR5 et CXCR4 jouent un rôle majeur dans la détermination de ce tropisme et, par conséquent, du type cellulaire infecté.

Quelques années après la découverte du VIH, la tendance de certaines souches à induire la formation de syncytia a été observée⁴¹ et a permis de classer les souches virales comme étant *syncytium-inducing* (SI) ou *non-syncytium-inducing* (NSI). Les souches NSI,

³⁶ Mansky, L. M. and Temin, H. M. (1995) *J Virol* **69** (8), 5087-5094

³⁷ Sala, M., Wain-Hobson, S. and Schaeffer, F. (1995) *Embo J* **14** (18), 4622-4627

³⁸ Hu, W. S. and Temin, H. M. (1990) *Science* **250** (4985), 1227-1233

³⁹ Hu, W. S. and Temin, H. M. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (4), 1556-1560

⁴⁰ Jung, A., Maier, R., Vartanian, J. P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S. and Meyerhans, A. (2002) *Nature* **418** (6894), 144

⁴¹ Tersmette, M., de Goede, R. E., Al, B. J., Winkel, I. N., Gruters, R. A., Cuypers, H. T., Huisman, H. G. and Miedema, F. (1988) *J Virol* **62** (6), 2026-2032

infectant prioritairement des macrophages et observées lors de la phase précoce et asymptomatique de la maladie, ont été nommées « M-tropiques ». Pour leur part, les isolats viraux SI, plus pathogènes, infectant principalement des lymphocytes T et observés lors de la manifestation symptomatique du SIDA, ont été désignés « T-tropiques »^{42,43}.

La découverte des corécepteurs CCR5 et CXCR4 a, par la suite, fourni les bases à l'élaboration d'une nomenclature précisant le tropisme viral. Les souches M-tropiques (ou NSI) utilisent principalement le récepteur CCR5 comme vecteur d'infection et ont, de ce fait, été nommées R5. Les souches virales T-tropiques (ou SI), utilisant préférentiellement CXCR4, ont, quant à elles, été appelées X4. Il existe également une troisième population virale, capable de se fixer indifféremment sur CCR5 ou CXCR4, qui a été désignée R5X4 ou *dual-tropic*⁴⁴. Comme les isolats viraux X4, les virus R5X4 ont été observés en corrélation avec la diminution drastique de la population lymphocytaire T et l'apparition d'infections opportunistes liées au SIDA (tableau II).

Souche	Cellule cible	Corécepteur utilisé	Pathogénicité
SI, T-tropique, X4	Lymphocyte T	CXCR4	+++
NSI, M-tropique, R5	Macrophage, monocyte	CCR5	+
Dual-tropique, R5X4	Macrophage, monocyte, lymphocyte T	CCR5 ou CXCR4	+++

Tableau II : nomenclature des souches de VIH en fonction de leur tropisme viral

❖ *Déterminants structuraux du tropisme*

Le tropisme viral est principalement lié à l'identité de certains acides aminés présents dans la boucle variable V3 de gp120 (cf II-1.2.2.). Une région bien conservée du feuillet intermédiaire⁴⁵ ainsi que les structures variables V1/V2 et la partie constante C4 de gp120 semblent également impliquées dans l'interaction et le choix des corécepteurs⁴⁶. Fortement conservé, le feuillet intermédiaire est impliqué dans la reconnaissance avec le corécepteur, alors que la structure et la charge de V3 conditionnent le choix du corécepteur⁴⁵. En effet, la boucle V3 d'une souche X4 présente plus de résidus positifs (6-9) que celle d'une souche R5 (3-6). Le rôle de la boucle V3 dans le tropisme viral est détaillé dans le chapitre II-1.2.2.

⁴² Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski, J. and Weiss, R. A. (1998) *Nature* **391** (6664), 240

⁴³ Richman, D. D. and Bozzette, S. A. (1994) *J Infect Dis* **169** (5), 968-974

⁴⁴ Simmons, G., Wilkinson, D., Reeves, J. D., Dittmar, M. T., Beddows, S., Weber, J., Carnegie, G., Desselberger, U., Gray, P. W., Weiss, R. A. and Clapham, P. R. (1996) *J Virol* **70** (12), 8355-8360

⁴⁵ Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. (1998) *Science* **280** (5371), 1949-1953

⁴⁶ Cho, M. W., Lee, M. K., Carney, M. C., Berson, J. F., Doms, R. W. and Martin, M. A. (1998) *J Virol* **72** (3), 2509-2515

❖ *La conversion phénotypique R5-X4*

Les souches R5 sont responsables de la transmission précoce du VIH. Au cours de l'infection, des souches X4 hautement pathogènes émergent chez environ 50% des individus contaminés, concordant avec la phase de SIDA. Expérimentalement, une souche R5 peut être convertie en X4, en changeant 2 ou 3 acides aminés (301, 306, 322) au niveau de la boucle V3⁴⁷ (cf II-1.2.2.). Etant donné le rapide renouvellement des virus et le taux d'erreurs au cours de la réplication élevé, cette conversion devrait apparaître rapidement chez un individu infecté.

Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer la prédominance des souches R5 au début de l'infection et les facteurs induisant la conversion phénotypique⁴⁸ :

1) la prédominance des isolats R5 pourrait s'expliquer par une sélection en faveur de ces souches au cours de la transmission (les premières cellules infectées expriment préférentiellement ou exclusivement CCR5 et les muqueuses expriment de forts taux de SDF-1 α , chimiokine liant spécifiquement CXCR4, bloquant ainsi ce corécepteur). Dans ce cas, la conversion R5-X4 serait due à une évolution par mutation de quelques acides aminés sur gp120.

2) le système immunitaire pourrait supprimer préférentiellement les souches X4⁴⁹. L'affaiblissement du système immunitaire au cours de l'évolution vers le stade de SIDA favoriserait ainsi l'émergence de virus X4. Dans ce sens, une étude⁵⁰ a récemment montré qu'un épitope particulier sur la boucle V3 était généralement masqué chez les souches R5, mais constitutivement exposé chez les souches X4. L'adoption d'une boucle V3 plus protégée peut donc conférer un avantage sélectif aux isolats R5. Etant donné le rôle crucial de la boucle V3 dans l'infection, de telles souches risquent néanmoins d'être moins infectieuses. Les souches X4, présentant en revanche une boucle V3 plus exposée, risquent d'être plus sensibles au système immunitaire (lorsque celui-ci fonctionne normalement, en début d'infection), mais également plus infectieuses.

3) La conversion phénotypique serait la conséquence d'un changement de la population lymphocytaire au cours du temps. Le taux de prolifération des lymphocytes T naïfs (exprimant CXCR4) augmente, favorisant ainsi la réplication des souches X4.

⁴⁷ Fouchier, R. A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F. and Schuitemaker, H. (1992) *J Virol* **66** (5), 3183-3187

⁴⁸ Regoes, R. R. and Bonhoeffer, S. (2005) *Trends Microbiol* **13** (6), 269-277

⁴⁹ Harouse, J. M., Buckner, C., Gettie, A., Fuller, R., Bohm, R., Blanchard, J. and Cheng-Mayer, C. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (19), 10977-10982

⁵⁰ Lusso, P., Earl, P. L., Sironi, F., Santoro, F., Ripamonti, C., Scarlatti, G., Longhi, R., Berger, E. A. and Burastero, S. E. (2005) *J Virol* **79** (11), 6957-6968

I-3. Pathologie du VIH

Le VIH possède la capacité d'infecter différentes cellules cibles. L'infection préférentielle d'une population cellulaire est parfois le signe de l'évolution de la pathologie.

I-3.1. Les cellules cibles du VIH

I-3.1.1. Passage du virus à travers les muqueuses

Dans le cas d'une contamination par voie sexuelle, le VIH, libre ou présent dans des cellules mononucléées (lymphocytes, macrophages), doit traverser les muqueuses épithéliales pour atteindre des sites de réplication dans les tissus lymphoïdes. Au niveau de ces muqueuses, les **cellules dendritiques** sont les principales cibles du VIH. Ces cellules sont classées en fonction des lectines calcium-dépendantes qu'elles expriment : DC-SIGN (*DC-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin* appelé aussi CD209) pour les DC et la langérine pour les cellules de Langerhans (LC). Les LC sont situées dans l'épiderme de la peau et de la plupart des muqueuses épithéliales alors que les DC sont localisées dans le sub-épithélium⁵¹.

DC-SIGN est capable de fixer le VIH (souches X4 ou R5), au niveau de gp120 avec une affinité supérieure à celle de l'interaction gp120/CD4⁵², et de l'endocytoser dans un compartiment endosomal⁵³. Le virus résiste à l'environnement acide de l'endosome et est alors protégé ; il peut rester infectieux pendant 25 jours *in vitro*⁵⁴. Par ailleurs, les DC expriment également les récepteurs nécessaires à l'infection classique par le VIH (CD4 et CCR5), ces cellules peuvent donc être infectées. L'événement biologique, endocytose du virus ou réelle infection, qui prédomine lors d'une exposition au VIH n'est pas connu. L'hypothèse est qu'il existe deux phases d'infection. Lors de la première phase qui survient rapidement après une exposition au VIH, les DC transfèrent le virus aux Lymphocytes T sans être infectées de façon productive. Dans la seconde phase, une fois que les DC sont réellement infectées, ce sont des virus nouvellement synthétisés qui sont transférés aux lymphocytes T⁵⁵. La première étape fait intervenir DC-SIGN qui transfère aussi bien les virus X4 que R5. En revanche, la deuxième phase implique les récepteurs CD4 et CCR5 et, de ce fait, pourrait permettre de sélectionner uniquement les souches R5, expliquant ainsi leur prédominance dans les étapes précoces de l'infection.

⁵¹ Patterson, B. K., Landay, A., Siegel, J. N., Flener, Z., Pessis, D., Chaviano, A. and Bailey, R. C. (2002) *Am J Pathol* **161** (3), 867-873

⁵² Curtis, B. M., Scharnowske, S. and Watson, A. J. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (17), 8356-8360

⁵³ Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A. and Littman, D. R. (2002) *Immunity* **16** (1), 135-144

⁵⁴ Smith, B. A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A. S., Stilianakis, N. I., Keele, B. F., Kerker, T. M., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A. K., Tew, J. G. and Burton, G. F. (2001) *J Immunol* **166** (1), 690-696

⁵⁵ Magerus-Chatinet, A., Yu, H., Garcia, S., Ducloux, E., Terris, B. and Bomsel, M. (2007) *Virology* **362** (1), 67-74

Récemment, une équipe⁵⁶ a montré que les DC expriment également le galactosyl ceramide (GalCer), un glycosphingolipide présent en grande quantité à la surface apicale des cellules épithéliales (cf ci-dessous) et dont le rôle de récepteur pour le VIH, *via* une interaction avec gp120 et gp41, a été démontré par plusieurs équipes^{57,58,59}. A la surface des DC, GalCer semble capturer le virus en interagissant avec gp41, l'internaliser puis le transférer aux lymphocytes T, sans infection apparente des DC. Lorsque GalCer est bloqué par un anticorps, le VIH infecte les DC de façon productive en utilisant CD4. Il semblerait que GalCer joue un rôle équivalent à celui de DC-SIGN, intervenant rapidement après une exposition au VIH⁵⁶. Dans les muqueuses épithéliales, le VIH rencontre également des LC. De nombreuses études ont montré que ces cellules, qui expriment CD4, CCR5 et la langerine mais ni DC-SIGN ni CXCR4, peuvent être infectées par le VIH^{60,61,62}. Récemment, d'autres travaux réalisés à partir de LC immatures ont, en revanche, montré que la langerine inhibe la transmission du VIH à travers les muqueuses épithéliales en endocytant le virus dans des granules de Birbeck⁶³. Les auteurs ont conclu que les travaux qui montrent une infection des LC utilisent de fortes concentrations de virus et que, par conséquent, cette infection ne se produit probablement pas *in vivo*. Les premières étapes de l'infection par le VIH au niveau des muqueuses restent donc, à l'heure actuelle, matière à controverse.

Les **cellules épithéliales** des muqueuses (CD4-) sont une autre voie potentielle pour l'entrée du VIH dans l'organisme. Elles peuvent, en effet, transcytoser le virus (X4 ou R5 indifféremment) de leur surface apicale vers leur partie basolatérale^{64,58}, sans pour autant devenir infectieuses. Ce mécanisme semble être beaucoup plus efficace lors d'un contact entre une cellule infectée du donneur et une cellule épithéliale du receveur que lors d'une transcytose d'un virus libre⁵⁸. En effet, pour un virus libre, l'efficacité de transcytose est inférieure à 1%⁶⁵.

Le phénomène de transcytose est extrêmement rapide (1h) et semble nécessiter une interaction entre les glycoprotéines gp120/gp41 et GalCer, ainsi que les protéoglycanes à

⁵⁶ Magerus-Chatinet, A., Yu, H., Garcia, S., Ducloux, E., Terris, B. and Bomsel, M. (2007) *Virology* **362** (1), 67-74

⁵⁷ Harouse, J. M., Laughlin, M. A., Pletcher, C., Friedman, H. M. and Gonzalez-Scarano, F. (1991) *J Leukoc Biol* **49** (6), 605-609

⁵⁸ Bomsel, M. (1997) *Nat Med* **3** (1), 42-47

⁵⁹ Alfsen, A. and Bomsel, M. (2002) *J Biol Chem* **277** (28), 25649-25659

⁶⁰ Reece, J. C., Handley, A. J., Anstee, E. J., Morrison, W. A., Crowe, S. M. and Cameron, P. U. (1998) *J Exp Med* **187** (10), 1623-1631

⁶¹ Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000) *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811

⁶² Kawamura, T., Kurtz, S. E., Blauvelt, A. and Shimada, S. (2005) *J Dermatol Sci* **40** (3), 147-155

⁶³ de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M. A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. B. (2007) *Nat Med* **13** (3), 367-371

⁶⁴ Fantini, J., Cook, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L. and Gonzalez-Scarano, F. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (7), 2700-2704

⁶⁵ Saidi, H., Magri, G., Nasreddine, N., Requena, M. and Belec, L. (2007) *Virology* **358** (1), 55-68

chaînes d'héparane sulfate (HSPG). Les héparanes sulfate (HS) sont des polysaccharides complexes présents à la surface de nombreuses cellules (cf III-) et, notamment, en grande quantité dans la partie apicale des cellules épithéliales^{66,67}. Selon les travaux d'Alfsen *et al.*⁶⁷, le VIH s'attacherait, *via* gp41, aux HSPG présents sur la surface apicale des cellules épithéliales. Cette interaction préalable modifierait l'orientation de gp41 dans une position favorable à la fixation sur GalCer. Cette interaction gp41/GalCer favoriserait alors le recrutement de GalCer au niveau de microdomaines sur la surface apicale et l'interaction ultérieure de GalCer avec gp120⁶⁸. Néanmoins, ces observations doivent être modérées puisque peu d'études ont rapporté une interaction entre les HSPG et gp41. De plus, des travaux ultérieurs⁶⁹ ont montré que GalCer n'intervient pas dans la transcytose du VIH à travers les cellules épithéliales et que les HSPG, seuls, permettent d'adsorber et de transcytoser le virus, *via* gp120, à la surface des cellules épithéliales. A la surface de ces mêmes cellules, les corécepteurs CCR5 et CXCR4 ne participent pas à l'attachement initial du virus mais facilitent, en revanche, son entrée dans la cellule. Certaines études ont, par ailleurs, montré que le virus peut traverser la barrière épithéliale de façon directe, en cas de lésions⁷⁰ ou en passant entre deux cellules épithéliales⁷¹.

Au niveau de certaines muqueuses (intestin grêle, colon, rectum), il existe des régions spécialisées, appelées plaques de Peyer. Elles sont constituées de follicules lymphoïdes recouverts par un épithélium singulier contenant des cellules épithéliales particulières, les **cellules M**, qui ont la capacité de transporter toutes sortes de particules, bactéries et virus présents dans la lumière intestinale et de les délivrer intacts au niveau du follicule lymphoïde sous-jacent. Ces particules et micro-organismes sont alors capturés et traités par les cellules dendritiques et les macrophages muqueux, étape initiale du déclenchement d'une réponse immunitaire locale. Les cellules M sont, en particulier, connues pour transporter le VIH de leur membrane apicale vers leur partie basale^{72,73}. Cette transcytose semble s'effectuer *via* le récepteur GalCer et le corécepteur CCR5⁷².

⁶⁶ Hocini, H. and Bomsel, M. (1999) *J Infect Dis* **179**, S448-453

⁶⁷ Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A. and Bomsel, M. (2005) *Mol Biol Cell*

⁶⁸ Alfsen, A. and Bomsel, M. (2002) *J Biol Chem* **277** (28), 25649-25659

⁶⁹ Bobardt, M. D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B. and Gallay, P. A. (2007) *J Virol* **81** (1), 395-405

⁷⁰ Fleming, D. T. and Wasserheit, J. N. (1999) *Sex Transm Infect* **75** (1), 3-17

⁷¹ Tan, X. and Phillips, D. M. (1996) *Arch Virol* **141** (7), 1177-1189

⁷² Fotopoulos, G., Harari, A., Michetti, P., Trono, D., Pantaleo, G. and Kraehenbuhl, J. P. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (14), 9410-9414

⁷³ Smith, P. D., Meng, G., Salazar-Gonzalez, J. F. and Shaw, G. M. (2003) *J Leukoc Biol* **74** (5), 642-649

I-3.1.2. Infection des cellules des organes lymphoïdes

Les cellules dendritiques, stimulées par le VIH, subissent un processus de maturation et deviennent des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette maturation est associée à une migration vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire. Cette migration est très rapide puisque 2 à 3 jours après l'inoculation du virus, on ne détecte plus de DC infectées dans les muqueuses épithéliales⁷⁴. Dans les organes lymphoïdes, les DC transmettent le virus aux **lymphocytes T** par des mécanismes d'infection classique, d'infection en *trans* (si la DC a seulement capturé le virus) ou par la mise en place de synapses virologiques (cf II-3.). Les **macrophages** sont également une cible privilégiée du VIH.

Les lymphocytes et les macrophages sont des cellules disséminées dans la plupart des organes, permettant à l'organisme sain de reconnaître les antigènes étrangers et de déclencher une réponse immunitaire physiologique. Elles expriment le récepteur CD4 et les corécepteurs nécessaires à l'infection par le VIH. Le niveau d'expression de CCR5 et CXCR4 varie en fonction de l'état de maturation des cellules : globalement, les macrophages expriment CCR5 alors que les lymphocytes T expriment les deux types de corécepteurs (CXCR4 prédomine sur les lymphocytes naïfs et CCR5 sur les lymphocytes activés et les lymphocytes mémoires⁷⁵). Récemment, il a été montré que certains types de macrophages expriment également DC-SIGN à leur surface et que ce récepteur pourrait jouer un rôle dans la transmission du virus aux lymphocytes T⁷⁶.

Les macrophages expriment également d'autres lectines, dont le récepteur à mannose, qui seraient impliquées de la même façon que DC-SIGN. Enfin, l'intégrine LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) est également présente à la surface des macrophages⁷⁷ et peut favoriser leur infection en se liant à son récepteur ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), parfois détecté sur l'enveloppe du VIH⁷⁸.

D'autres cellules du système immunitaire peuvent, à moindre échelle, être la cible du VIH : les **lymphocytes B**⁷⁹, les **neutrophiles**⁸⁰, les **mastocytes**⁸¹, les **lymphocytes T CD8+**⁸²,

⁷⁴ Zhang, Z. Q., Schuler, T., Cavert, W., Notermans, D. W., Gebhard, K., Henry, K., Havlir, D. V., Gunthard, H. F., Wong, J. K., Little, S., Feinberg, M. B., Polis, M. A., Schragar, L. K., Schacker, T. W., Richman, D. D., Corey, L., Danner, S. A. and Haase, A. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (9), 5169-5172

⁷⁵ Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A. and Mackay, C. R. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (5), 1925-1930

⁷⁶ Granelli-Piperno, A., Pritsker, A., Pack, M., Shimeliovich, I., Arrighi, J. F., Park, C. G., Trumppeller, C., Piguët, V., Moran, T. M. and Steinman, R. M. (2005) *J Immunol* **175** (7), 4265-4273

⁷⁷ Hioe, C. E., Chien, P. C., Jr., Lu, C., Springer, T. A., Wang, X. H., Bandres, J. and Tuen, M. (2001) *J Virol* **75** (2), 1077-1082

⁷⁸ Paquette, J. S., Fortin, J. F., Blanchard, L. and Tremblay, M. J. (1998) *J Virol* **72** (11), 9329-9336

⁷⁹ De Silva, F. S., Venturini, D. S., Wagner, E., Shank, P. R. and Sharma, S. (2001) *AIDS Res Hum Retroviruses* **17** (17), 1585-1598

⁸⁰ Ali, A., Jamieson, B. D. and Yang, O. O. (2003) *J Virol Methods* **110** (2), 137-142

⁸¹ Sundstrom, J. B., Little, D. M., Villinger, F., Ellis, J. E. and Ansari, A. A. (2004) *J Immunol* **172** (7), 4391-4401

⁸² Zerhouni, B., Nelson, J. A. and Saha, K. (2004) *J Virol* **78** (22), 12288-12296

les **cellules NK et NKT** (*Natural Killer et Natural Killer T cells*)⁸³.

Les **adipocytes** expriment à la fois CD4 et les corécepteurs et, de ce fait, peuvent être infectés de façon productive par le VIH⁸⁴. La conséquence de cette infection sur l'organisme est encore inconnue.

I-3.1.3. Infection du système nerveux

Parallèlement à l'infection du système immunitaire, le VIH pénètre souvent le système nerveux central (SNC) rapidement après l'infection des organes périphériques (60% des personnes infectées). Ces patients présentent généralement des prédispositions génétiques favorisant l'infection et le développement des pathologies associées⁸⁵. Une fois dans le SNC, le virus induit des problèmes neurologiques plus ou moins conséquents : perte de mémoire, faiblesse des membres, dépression, comportements anormaux, dysfonctionnements moteurs, voire démence dans 10% des cas. La barrière hématoencéphalique est une couche de cellules endothéliales microvasculaires sélectivement perméables, qui régule la circulation de cellules et de substances entre le SNC et le sang. Ces cellules n'expriment pas CD4. Elles expriment CCR5, CXCR4 et DC-SIGN mais le blocage de ces molécules n'inhibe pas la fixation du virus⁸⁶, suggérant ainsi que le mécanisme d'infection est dirigé par d'autres récepteurs.

Les macrophages et, à moindre échelle, les lymphocytes T infectés et les virus libres peuvent migrer à travers l'épithélium vasculaire par différents mécanismes (*figure 5*) incluant le passage direct entre deux cellules épithéliales ou la transcytose au niveau d'une cellule épithéliale. L'implication des HS dans la fixation du virus sur la barrière hématoencéphalique et dans les phénomènes de transcytose a parfois été observée^{87,88}. De même, l'implication des radeaux lipidiques, des microdomaines membranaires enrichis en lipides (cf II-3.), lors de la transcytose a été proposée⁸⁹ puis contredite par des études publiées ultérieurement⁸⁷.

Les **macrophages périvasculaires** et les **cellules microgliales** sont les principales cibles du VIH dans le SNC⁹⁰. Ces cellules possèdent CD4 et CCR5 et sont donc sensibles à l'infection par les souches R5.

⁸³ Valentin, A. and Pavlakakis, G. N. (2003) *Anticancer Res* **23** (3A), 2071-2075

⁸⁴ Hazan, U., Romero, I. A., Canello, R., Valente, S., Perrin, V., Mariot, V., Dumonceaux, J., Gerhardt, C. C., Strosberg, A. D., Couraud, P. O. and Pietri-Rouxel, F. (2002) *Faseb J* **16** (10), 1254-1256

⁸⁵ Tardieu, M. (1999) *Curr Opin Neurol* **12** (4), 377-381

⁸⁶ Mukhtar, M., Duke, H., BouHamdan, M. and Pomerantz, R. J. (2000) *Hum Gene Ther* **11** (2), 347-359

⁸⁷ Argyris, E. G., Acheampong, E., Nunnari, G., Mukhtar, M., Williams, K. J. and Pomerantz, R. J. (2003) *J Virol* **77** (22), 12140-12151

⁸⁸ Bobardt, M. D., Salmon, P., Wang, L., Esko, J. D., Gabuzda, D., Fiala, M., Trono, D., Van der Schueren, B., David, G. and Gallay, P. A. (2004) *J Virol* **78** (12), 6567-6584

⁸⁹ Liu, N. Q., Lossinsky, A. S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M. and Fiala, M. (2002a) *J Virol* **76** (13), 6689-6700

⁹⁰ Takahashi, K., Wesselingh, S. L., Griffin, D. E., McArthur, J. C., Johnson, R. T. and Glass, J. D. (1996) *Ann Neurol* **39** (6), 705-711

Les **astrocytes**, type cellulaire majoritaire dans le cerveau, ne possèdent pas le récepteur CD4 mais expriment CXCR4 et peut-être CCR5⁹¹. Si plusieurs études ont montré que ce type cellulaire pouvait être infecté par le VIH, le mécanisme d'infection reste néanmoins inconnu à l'heure actuelle : il est possible qu'il soit dirigé par GalCer ou le récepteur à mannose⁹², tous les deux présents à la surface des astrocytes. Les astrocytes semblent être infectés de façon non productive, c'est-à-dire que l'infection ne résulte pas en une forte production de virus. Ils constituent, en revanche, un réservoir de virus (cf I-3.1.4.).

Les neurones ne sont pas infectés. Cependant, les substances neurotoxiques relarguées par les cellules microgliales et les macrophages infectés (gp120, des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , des chimiokines, des excitotoxines et des protéases) peuvent induire l'apoptose des neurones.

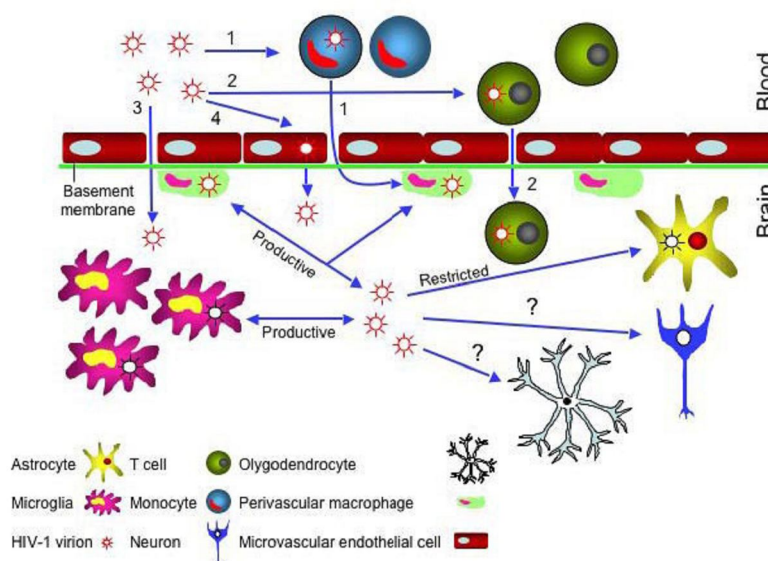


Figure 5 : la neuroinvasion du VIH⁹³

Le VIH peut passer la barrière hématoencéphalique par différents mécanismes : 1) migration de monocytes infectés qui se différencient ensuite en macrophages périvasculaires 2) migration de lymphocytes T infectés 3) entrée directe de virus libre 4) entrée du virus par transcytose à travers les cellules endothéliales vasculaires, au niveau des radeaux lipidiques⁹⁴. Le virus infecte ensuite les macrophages et les cellules microgliales. L'infection des astrocytes est assez restreinte.

I-3.1.4. Protection du virus et réservoirs viraux

Plusieurs études ont montré que certains types cellulaires, *via* leurs récepteurs d'attachement, sont capables de protéger le virus pendant plusieurs jours, voire plusieurs

⁹¹ Gorry, P. R., Ong, C., Thorpe, J., Bannwarth, S., Thompson, K. A., Gagnon, A., Vesselingh, S. L. and Purcell, D. F. (2003) *Curr HIV Res* **1** (4), 463-473

⁹² Liu, Y., Liu, H., Kim, B. O., Gattone, V. H., Li, J., Nath, A., Blum, J. and He, J. J. (2004) *J Virol* **78** (8), 4120-4133

⁹³ Ghafouri, M., Amini, S., Khalili, K. and Sawaya, B. E. (2006) *Retrovirology* **3**, 28

⁹⁴ Liu, N. Q., Lossinsky, A. S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M. and Fiala, M. (2002) *J Virol* **76** (13), 6689-6700

semaines. Par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages peuvent capturer et internaliser le virus dans des endosomes où le virus, apparemment résistant aux conditions acides, peut persister de plusieurs jours pour les cellules dendritiques⁹⁵ à plusieurs semaines pour les macrophages^{96,97}. De même, les cellules endothéliales, riches en HS mais non permissives pour la réplication du VIH, sont capables de fixer le virus à leur surface *via* leurs HSPG⁹⁸. Cette fixation permet d'augmenter la résistance des virus (de 1 jour pour un virus libre à 6 jours pour un virus fixé aux HS). Les cellules endothéliales présentent ensuite le virus aux lymphocytes T, permissifs mais exprimant peu d'HS. Deux hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène. La première consiste à penser que les HSPG pourraient permettre l'internalisation du virus dans les cellules endothéliales, de la même manière que DC-SIGN à la surface des cellules dendritiques. L'autre hypothèse est que les longues chaînes anioniques des HS pourraient directement protéger le virus de la dégradation, sans l'internaliser.

Certaines cellules sont, par ailleurs, capables de protéger le virus pendant plusieurs années. Lorsque la trithérapie est apparue au milieu des années 1990, il a initialement été conclu qu'un traitement prolongé pourrait permettre d'éliminer le virus. Depuis, il a été prouvé que, dans certaines conditions, le virus peut persister des années en présence d'antirétroviraux. On parle, dans ce cas, de **réservoirs viraux**. Les lymphocytes T mémoires constituent majoritairement ces réservoirs. Les lymphocytes T activés sont très sensibles à l'infection par le VIH et sont généralement détruits rapidement, soit par les effets du virus, soit par la réponse immunitaire. Cependant, certaines cellules peuvent être infectées et retourner à l'état de repos, sous la forme de lymphocytes mémoires⁹⁹. Ils peuvent alors être activés lors d'une interruption de la trithérapie. Cette latence est due à plusieurs facteurs : faible stock de nucléotides, facteurs de transcription (NF- κ B) exclus du noyau à l'état de repos, incapacité d'importer l'ADN viral dans le noyau^{100,101}. Ces réservoirs sont extrêmement stables et des études ont estimé la demi-vie de ces cellules à 44 mois. Dans ces conditions, il faudrait plus de 73 années de thérapie pour éradiquer les virus de ces réservoirs.

⁹⁵ Smith, B. A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A. S., Stilianakis, N. I., Keele, B. F., Kerker, T. M., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A. K., Tew, J. G. and Burton, G. F. (2001) *J Immunol* **166** (1), 690-696

⁹⁶ Pelchen-Matthews, A., Kramer, B. and Marsh, M. (2003) *J Cell Biol* **162** (3), 443-455

⁹⁷ Sharova, N., Swingle, C., Sharkey, M. and Stevenson, M. (2005) *Embo J* **24** (13), 2481-2489

⁹⁸ Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. and Galloway, P. A. (2003) *Immunity* **18** (1), 27-39

⁹⁹ Chun, T. W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D. and Siliciano, R. F. (1995) *Nat Med* **1** (12), 1284-1290

¹⁰⁰ Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. and Stevenson, M. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (14), 6580-6584

¹⁰¹ Zack, J. A., Haislip, A. M., Krogstad, P. and Chen, I. S. (1992) *J Virol* **66** (3), 1717-1725

Enfin, dans le système nerveux central, les cellules microgliales¹⁰² et les astrocytes¹⁰³ peuvent conserver le virus dans un état latent.

I-3.2. Les différentes phases de la maladie

La maladie évolue en trois phases successives.

La phase de primo-infection peut être symptomatique ou asymptomatique (cliniquement silencieuse). Lorsqu'elle est symptomatique (chez 50% des sujets infectés), elle se manifeste par des signes généraux peu spécifiques : adénopathies cervicales, fièvre, pharyngite avec dysphagie, fatigue, myalgies, courbatures, éruption maculopapuleuse. Comme ces symptômes ressemblent à ceux observés au cours de diverses affections virales aiguës (comme la mononucléose infectieuse), la primo-infection risque souvent de passer inaperçue. Les premiers signes d'infection apparaissent en moyenne 20 jours après la contamination et durent de 1 à 3 semaines. Cette phase correspond à une multiplication virale intense et à la dissémination du virus. L'évolution vers le SIDA est plus rapide après une primo-infection symptomatique (on constate en effet une charge virale très élevée). Le système immunitaire réagit à l'infection et, en quelques semaines, des anticorps apparaissent dans le sérum, dirigés contre l'ensemble des protéines du VIH, c'est la séroconversion : le sujet infecté devient séropositif.

La deuxième phase est asymptomatique et peut être très prolongée (10 à 15 ans). Le virus se réplique continuellement dans les organes lymphoïdes : les lymphocytes T vont lentement, mais inexorablement, diminuer.

Enfin, la phase clinique correspond au SIDA proprement dit : lorsque le nombre de lymphocytes T devient inférieur à 200 / mm³, le syndrome d'immunodéficience apparaît. Les manifestations les plus fréquentes sont des infections opportunistes.

I-3.3. Le diagnostic

Les centres de lutte et de prévention contre les maladies, sous l'égide de l'OMS, ont établi une définition officielle pour le diagnostic du SIDA. Ce diagnostic dépend à la fois du nombre de cellules CD4+/mm³ de sang (on distingue trois catégories : >500 ; entre 200 et 500 ; <200) et de la présence de maladies opportunistes caractéristiques.

Le diagnostic sérologique s'opère en deux étapes. La première consiste à effectuer un test de dépistage environ trois mois après le risque de contamination. La recherche des

¹⁰² Ryzhova, E. V., Crino, P., Shawver, L., Westmoreland, S. V., Lackner, A. A. and Gonzalez-Scarano, F. (2002) *Virology* **297** (1), 57-67

¹⁰³ Liu, Y., Liu, H., Kim, B. O., Gattone, V. H., Li, J., Nath, A., Blum, J. and He, J. J. (2004) *J Virol* **78** (8), 4120-4133

anticorps anti-VIH est réalisée par des tests ELISA. Deux essais différents sont pratiqués sur le même sérum dont l'un doit permettre le dépistage des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Si la recherche est positive, le résultat doit être confirmé par Western Blot. Il est recommandé d'effectuer le diagnostic de confirmation sur un prélèvement différent de celui de l'examen de dépistage.

D'autres tests peuvent servir à diagnostiquer l'infection : la recherche de l'antigène p24, l'isolement du virus en culture et la détection du matériel génétique viral.

I-3.4. SIDA et maladies opportunistes

Ces maladies profitent d'un système immunitaire qui n'est plus capable de protéger l'organisme. L'apparition de n'importe laquelle des vingt-cinq infections opportunistes confirme le diagnostic clinique du SIDA chez les individus séropositifs.

L'infection opportuniste la plus fréquente est la pneumonie par *Pneumocystis carinii* provoquée par un champignon qui existe dans les voies aériennes de tous les individus. On remarque aussi des pneumonies bactériennes (dus à plusieurs types de bactéries dont *Streptococcus* et *Haemophilus*) et la tuberculose (infection respiratoire bactérienne causée par *Mycobacterium tuberculosis*).

Au cours de la phase tardive du SIDA, la dissémination de l'infection par *Mycobacterium avium* peut provoquer fièvre, perte de poids, anémie et diarrhée. Des symptômes associés à certaines infections bactériennes du tube digestif (dus à *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* ou d'autres bactéries) peuvent aussi apparaître. D'autres infections fongiques, ou mycoses, sont fréquemment observées chez les patients. La candidose orale ou muguet (infection de la bouche par le champignon *Candida*) survient au début de la phase symptomatique chez un grand nombre de patients. Des infections par des espèces de *Cryptococcus* se produisent parfois, provoquant des méningites chez un patient sur dix. Des histoplasmoses dues à *Histoplasma capsulatum* affectent jusqu'à 10 % des patients et causent une perte de poids, de la fièvre et des complications respiratoires, ainsi que de graves complications au niveau du SNC, y compris des formes de démence.

Les infections opportunistes virales, spécialement par des membres de la famille des virus de l'herpès, sont fréquentes. L'un des membres de cette famille, le cytomégalovirus (CMV), infecte la rétine et peut causer la cécité. Un autre virus de la même famille, le virus *Epstein-Barr*, peut entraîner la transformation cancéreuse des globules sanguins. Les infections par les virus herpétiques de type 1 et 2 provoquent des lésions orales et périanales évolutives.

De nombreux malades du SIDA développent des cancers, dont les plus communs sont le sarcome de Kaposi et le lymphome malin (ou hématosarcome) à cellules B. Le sarcome de Kaposi est un cancer des vaisseaux sanguins qui provoque des lésions cutanées pourpres pouvant s'étendre aux organes internes et provoquer la mort.

Le VIH pénètre le SNC très rapidement après l'infection périphérique et peut induire des problèmes neurologiques sévères, incluant un comportement anormal, des dysfonctionnements moteurs, voire la démence. Les macrophages infectés peuvent infiltrer le SNC et provoquer une réponse neuropathologique de différentes cellules neuronales (cf I-3.1.3.).

I-4. Les stratégies thérapeutiques

Bien que l'infection par le VIH déclenche une réponse immune de l'organisme, celle-ci ne permet pas de lutter efficacement contre cet agent pathogène. Cette faiblesse est en partie due à la très grande variabilité antigénique du virus et à l'affaiblissement du système immunitaire. Ces observations ont rendu problématique l'élaboration de vaccins capables d'inhiber l'infection et la propagation du virus.

La stratégie de lutte anti-VIH-1 ne pouvait dès lors se contenter d'une seule approche et plusieurs étapes critiques de la relation entre le virus et l'hôte ont été explorées afin d'identifier les paramètres susceptibles de bloquer l'infection.

I-4.1. Les inhibiteurs de la réplication virale

Les premières stratégies développées pour lutter contre le VIH se sont focalisées sur un certain nombre d'étapes clefs du cycle de réplication virale et ont conduit à la production de plusieurs agents antirétroviraux. D'une part, des inhibiteurs de la transcriptase inverse, molécules analogues ou non de nucléotides, permettent de bloquer l'activité de cette enzyme responsable de la synthèse d'ADN viral et, d'autre part, des inhibiteurs de la protéase miment la structure du substrat originel et empêchent la protéase virale de cliver les précurseurs des protéines constitutives de la capsid du virus.

❖ Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Trois classes de médicaments contre le VIH prennent pour cible la transcriptase inverse.

Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) sont des composés, utilisés dans les traitements contre le VIH, qui ressemblent aux désoxynucléosides naturels.

L'AZT (azidothymidine), premier composé antirétroviral, a été synthétisé en 1964 en tant qu'anti-cancéreux. Son activité antirétrovirale a été démontrée en 1985 sur le VIH¹⁰⁴ et il a ensuite été le premier INTI approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*), en 1987. Par la suite, d'autres analogues de nucléosides, dont le d4T, le 3TC et le ddC, ont été synthétisés pour être administrés en combinaison avec l'AZT. Pour être actifs, les INTI doivent être phosphorylés par la cellule. Sous forme triphosphorylée, ils s'incorporent à la chaîne d'ADN en formation lors de la transcription inverse de l'ARN du virus et en bloquent l'étape finale. Ces analogues sont néanmoins toxiques puisqu'ils agissent également sur les processus naturels de multiplication cellulaire.

Les inhibiteurs non-nucléosidiques (INNTI) ne sont pas des analogues compétitifs des nucléosides ; ils bloquent la synthèse d'ADN viral en se fixant aux sites actifs de la transcriptase inverse et l'empêchent ainsi de fonctionner. Etant donné qu'ils ciblent uniquement une protéine virale, leurs effets secondaires sont plus faibles. Parmi les INNTI, les plus souvent utilisés sont l'*Efavirenz* et la *Nevirapine*. Malgré un mécanisme différent, l'action sur le cours de l'infection est le même que celui des INTI.

La troisième classe d'antirétroviraux actuellement utilisée est celle des inhibiteurs nucléotidiques. *Tenofovir* est le seul médicament de cette classe prescrit sur ordonnance. Ces inhibiteurs sont très similaires aux analogues nucléosidiques mis à part qu'ils sont déjà phosphorylés et entrent, de ce fait, directement en action, une fois injectés dans l'organisme.

❖ *Les inhibiteurs de la protéase*

La protéase participe à la synthèse des protéines virales, en clivant notamment les polyprotéines Gag et Gag-Pol en composants protéiques individuels. Les inhibiteurs de la protéase sont des analogues structuraux des séquences peptidiques clivées par la protéase. En se fixant au site catalytique de la protéase, ils bloquent de façon sélective et réversible son activité protéolytique, indispensable à la production de virus matures et fonctionnels.

La combinaison de ces inhibiteurs sous la forme de trithérapie, nommée HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), mise en place depuis le milieu des années 90 dans les pays industrialisés a entraîné une baisse significative de la mortalité, reflet du plus long délai d'infection asymptomatique puis de progression vers le SIDA. Cependant, plusieurs observations viennent tempérer l'espoir qui avait été mis dans ces approches

¹⁰⁴ Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W. and Broder, S. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (20), 7096-7100

médicamenteuses. En effet, bien que le blocage simultané de la transcriptase inverse et de protéase du VIH, lors de ces thérapies HAART, provoque une diminution rapide de la virémie jusqu'à un niveau indécélable, une résurgence du virus a été tout de même constatée chez 30 à 40 % des patients sous traitement¹⁰⁵. De plus, le virus peut être intégré dans des lymphocytes T formant un réservoir de cellules mémoires et échapper ainsi aux inhibiteurs¹⁰⁶. Par ailleurs, l'apparition de nouvelles souches virales mutantes multi-résistantes aux antirétroviraux observée lors de ces thérapies combinées rend cette approche délicate dans son application à long terme¹⁰⁷.

Ces observations ne sont pas encourageantes dans la mesure où elles viennent se joindre à la toxicité et à la complexité de ces traitements ainsi qu'aux coûts élevés de ces médicaments.

I-4.2. Les inhibiteurs de l'entrée virale

Les effets secondaires rencontrés lors de l'usage d'inhibiteurs de la réplication virale, la découverte des récepteurs et l'élucidation des mécanismes d'entrée virale ont encouragé l'exploration de nouvelles voies d'inhibition virale, plus particulièrement celles se situant en amont de la pénétration du virus dans les cellules cibles (tableau III). La stratégie d'une inhibition de l'entrée virale présenterait le double avantage d'être un moyen préventif mais également thérapeutique dans la lutte anti-VIH.

❖ *Inhibiteurs de l'attachement viral*

L'adsorption du virus à la surface des cellules peut être réalisée par une interaction entre la boucle V3 de gp120 et les HSPG, chargés négativement, à la surface cellulaire (cf III-3.). Des composés sulfatés, tels que le dextran sulfate ou l'héparine, peuvent inhiber la fixation d'anticorps dirigés contre la boucle V3 sur gp120, *in vitro*^{108,109}. La dextrine-2-sulfate, un dérivé synthétique de la dextrine, est actuellement en essais cliniques de phase III¹¹⁰. Cette partie sera détaillée dans le chapitre III-3.3.2.

¹⁰⁵ Ledergerber, B., Egger, M., Opravil, M., Telenti, A., Hirschel, B., Battegay, M., Vernazza, P., Sudre, P., Flepp, M., Furrer, H., Francioli, P. and Weber, R. (1999) *Lancet* **353** (9156), 863-868

¹⁰⁶ Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T. C., Chaisson, R. E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J. and Siliciano, R. F. (1999) *Nat Med* **5** (5), 512-517

¹⁰⁷ Iversen, A. K., Shafer, R. W., Wehrly, K., Winters, M. A., Mullins, J. I., Chesebro, B. and Merigan, T. C. (1996) *J Virol* **70** (2), 1086-1090

¹⁰⁸ Callahan, L. N., Phelan, M., Mallinson, M. and Norcross, M. A. (1991) *J Virol* **65** (3), 1543-1550

¹⁰⁹ Harrop, H. A., Coombe, D. R. and Rider, C. C. (1994) *Aids* **8** (2), 183-192

¹¹⁰ Castagna, A., Biswas, P., Beretta, A. and Lazzarin, A. (2005) *Drugs* **65** (7), 879-904

❖ *Inhibiteurs de l'interaction gp120/CD4*

Après avoir découvert le rôle du récepteur cellulaire CD4 et l'implication des glycoprotéines membranaires gp120/gp41 du VIH, les recherches se sont tournées vers ces éléments afin d'inhiber leur liaison.

Les premiers travaux ciblant l'inhibition de l'interaction gp120/CD4 ont démontré que du **CD4 soluble** recombinant (sCD4) était capable de bloquer l'infection par des souches VIH de laboratoire¹¹¹. Ces fragments de sCD4 se sont cependant révélés inactifs sur des isolats cliniques. Par la suite, la protéine hybride **PRO 542**, constituée de quatre copies des domaines D1 et D2 de CD4 (cf II-2.1.1.) liées à la région constante de l'IgG2 humaine, a été testée *in vitro* et validée pour son activité antirétrovirale¹¹². Le couplage de cette partie de l'IgG2 a permis de résoudre les problèmes liés à la courte demi-vie du CD4 soluble et à sa faible pénétration dans les tissus (3 jours avec une seule injection intraveineuse pour le PRO 542 contre 15 min pour du sCD4). Le PRO 542 est actuellement développé par Progenics Pharmaceuticals et a été testé en phases I/II d'essais cliniques. Il semble bien toléré et aucune dose limite de toxicité n'a été identifiée à ce jour. Des essais de production à grande échelle ont été tentés dans le lait de chèvres transgéniques, dans des lignées cellulaires et dans des plantes¹¹³. Le **BMS-488043**, une molécule de petite taille (406,5 Da) créée par synthèse chimique (Bristol-Myers Squibb), a montré une efficacité contre un panel de souches VIH de tropisme X4, R5 ou R5X4¹¹⁴. Ce dérivé 4-methoxy-7-azaindole se lie de façon compétitive et réversible à gp120, au niveau du site de fixation à CD4^{115,116}. Des analyses de dynamique moléculaire ont montré que le BMS-488043 insère son noyau azaindole dans la cavité de gp120 accueillant habituellement la Phe43 du récepteur CD4 (cf II-2.1.2.) et interagit avec plusieurs résidus de gp120 situés dans, et à proximité de cette cavité¹¹⁷. Néanmoins, Si *et al.*¹¹⁸ ont suggéré que l'inhibition de l'entrée virale par le BMS-488043 pouvait avoir lieu après la fixation de gp120 à CD4. Le BMS-488043 est actuellement en phase II d'essais cliniques et présente de meilleures propriétés pharmacocinétiques que son prédécesseur, le BMS-378806.

¹¹¹ Deen, K. C., McDougal, J. S., Inacker, R., Folena-Wasserman, G., Arthos, J., Rosenberg, J., Maddon, P. J., Axel, R. and Sweet, R. W. (1988) *Nature* **331** (6151), 82-84

¹¹² Parren, P. W., Moore, J. P., Burton, D. R. and Sattentau, Q. J. (1999) *Aids* **13**, 137-162

¹¹³ Castagna, A., Biswas, P., Beretta, A. and Lazzarin, A. (2005) *Drugs* **65** (7), 879-904

¹¹⁴ Lin, P. F., Blair, W., Wang, T., Spicer, T., Guo, Q., Zhou, N., Gong, Y. F., Wang, H. G., Rose, R., Yamanaka, G., Robinson, B., Li, C. B., Fridell, R., Deminie, C., Demers, G., Yang, Z., Zadjura, L., Meanwell, N. and Colonno, R. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (19), 11013-11018

¹¹⁵ Guo, Q., Ho, H. T., Dicker, I., Fan, L., Zhou, N., Friborg, J., Wang, T., McAuliffe, B. V., Wang, H. G., Rose, R. E., Fang, H., Scarnati, H. T., Langley, D. R., Meanwell, N. A., Abraham, R., Colonno, R. J. and Lin, P. F. (2003) *J Virol* **77** (19), 10528-10536

¹¹⁶ Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. and Harrison, S. C. (2005) *Nature* **433** (7028), 834-841

¹¹⁷ Kong, R., Tan, J. J., Ma, X. H., Chen, W. Z. and Wang, C. X. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1764** (4), 766-772

¹¹⁸ Si, Z., Madani, N., Cox, J. M., Chruma, J. J., Klein, J. C., Schon, A., Phan, N., Wang, L., Biorn, A. C., Cocklin, S., Chaiken, I., Freire, E., Smith, A. B., 3rd and Sodroski, J. G. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (14), 5036-5041

L'utilisation d'**anticorps** dirigés contre le complexe Env du virus a été également explorée, mais les mécanismes régissant la neutralisation virale ne sont pas encore complètement élucidés. On relèvera tout de même l'existence d'anticorps dirigés contre les épitopes situés sur gp120, au niveau des boucles hypervariables V1, V2, V3 et le site de fixation à CD4 de gp120. Un anticorps anti-gp41, le 2F5, a également montré un bon comportement antiviral¹¹⁹. Le **TNX 355** (société Tanox), un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine D2 de CD4, est actuellement en essais cliniques de phase II. Son épitope est différent de celui de gp120 (domaine D1) et, de ce fait, le TNX 355 ne bloque pas l'interaction gp120/CD4 mais plutôt les changements conformationnels de gp120 induits par la fixation à CD4¹²⁰. Cet anticorps se fixe aux lymphocytes T et aux macrophages.

Les lectines spécifiques du mannose constituent une stratégie supplémentaire d'inhibition de l'entrée virale. Parmi celles-ci, la **cyanovirine-N**, isolée de la cyanobactérie *Nostoc ellipsosporum*, a montré un certain potentiel à bloquer l'infection par le VIH. Il s'agit d'une protéine de 11 kDa qui se fixe aux oligosaccharides riches en mannose de gp120¹²¹ et probablement gp41¹²². Ce composé est actuellement en développement préclinique pour être utilisé sous la forme d'un microbicide. De nombreuses **lectines dérivées des plantes** (*Galanthus nivalis* agglutinin ou GNA, *Hippeastrum hybrid* agglutinin ou HHA, la Concanavaline A, *Urtica dioica* agglutinin ou UDA) agissent selon le même principe et peuvent, de ce fait, constituer des microbicides potentiels¹²³.

Des études ont, par ailleurs, permis d'identifier le cyclotriazadisulfonamide (CADA), un composé qui sous-régule l'expression de CD4 et inhibe, de ce fait, l'infection par le VIH¹²⁴. Cette molécule a montré un effet synergique, associée à des inhibiteurs de la transcriptase inverse, de la protéase ou aux inhibiteurs de fusion T20 et AMD3100.

¹¹⁹ Ugolini, S., Mondor, I., Parren, P. W., Burton, D. R., Tilley, S. A., Klasse, P. J. and Sattentau, Q. J. (1997) *J Exp Med* **186** (8), 1287-1298

¹²⁰ Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Klasse, P. J. and Burkly, L. C. (1992) *J Virol* **66** (8), 4784-4793

¹²¹ Boyd, M. R., Gustafson, K. R., McMahon, J. B., Shoemaker, R. H., O'Keefe, B. R., Mori, T., Gulakowski, R. J., Wu, L., Rivera, M. I., Laurencot, C. M., Currens, M. J., Cardellina, J. H., 2nd, Buckheit, R. W., Jr., Nara, P. L., Pannell, L. K., Sowder, R. C., 2nd and Henderson, L. E. (1997) *Antimicrob Agents Chemother* **41** (7), 1521-1530

¹²² O'Keefe, B. R., Shenoy, S. R., Xie, D., Zhang, W., Muschik, J. M., Currens, M. J., Chaiken, I. and Boyd, M. R. (2000) *Mol Pharmacol* **58** (5), 982-992

¹²³ Balzarini, J., Hatse, S., Vermeire, K., Princen, K., Aquaro, S., Perno, C. F., De Clercq, E., Egberink, H., Vanden Mooter, G., Peumans, W., Van Damme, E. and Schols, D. (2004) *Antimicrob Agents Chemother* **48** (10), 3858-3870

¹²⁴ Vermeire, K. and Schols, D. (2003) *J Leukoc Biol* **74** (5), 667-675

❖ Antagonistes des corécepteurs

La découverte du rôle joué par les corécepteurs CCR5 et CXCR4^{125,126} dans l'infection virale et l'effet inhibiteur de leurs ligands naturels, les chimiokines RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β (pour CCR5) et SDF-1 α (pour CXCR4)^{127,128,129,130} ont montré la voie dans la conception de nouvelles stratégies antivirales. Il existe trois types d'inhibiteurs de l'entrée virale ciblant les corécepteurs : les inhibiteurs de faible poids moléculaire, les anticorps et les chimiokines¹³¹.

Plusieurs **inhibiteurs de faible poids moléculaire** sont actuellement connus pour leur action antagoniste sur les récepteurs CCR5 et CXCR4. Le récepteur CCR5 est une cible intéressante à viser du fait de son usage prédominant par les souches VIH. De plus, une mutation particulière, CCR5 Δ 32, aboutissant à l'absence d'expression de CCR5, a été observée chez certains individus (cf II-2.2.2.). Des études concernant cette mutation ont montré que les personnes ne possédant pas de récepteurs CCR5 fonctionnels ne présentent pas de pathologie particulière et sont résistants au VIH, validant CCR5 comme cible dans la lutte antivirale. De ce fait, le blocage de CCR5 pourrait être sans conséquence sur l'organisme. CCR5 possède plusieurs antagonistes capables d'inhiber la liaison des souches virales R5 : le TAK-220 (Takeda Chemical Industries), le SCH-D ou SCH-417690 (Schering-Plough), l'UK-427857 (Pfizer), le GSK-873140 (GlaxoSmithKline) et l'AMD-887 (AnorMED). Ces composés inhibent tous l'entrée du VIH dans les cellules en bloquant l'interaction du complexe gp120/CD4 avec CCR5^{132,133}. Le mécanisme précis est, à l'heure actuelle, inconnu ; cependant, des études suggèrent que ces molécules se fixent sur le domaine transmembranaire de CCR5 au niveau de résidus spécifiques¹³⁴. Le danger d'utiliser des composés bloquant CCR5 réside dans le fait que pour échapper à ces antagonistes, les souches virales R5 pourraient muter vers la forme X4 et entraîner ainsi une progression vers le stade de SIDA plus rapide. Une étude sur ce changement de tropisme viral a montré qu'un traitement de dix

¹²⁵ Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. and Paxton, W. A. (1996) *Nature* **381** (6584), 667-673

¹²⁶ Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. and Berger, E. A. (1996) *Science* **272** (5263), 872-877

¹²⁷ Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. and Lusso, P. (1995) *Science* **270** (5243), 1811-1815

¹²⁸ Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Rousset, D., Clark-Lewis, I., Loetscher, P., Moser, B. and Baggiolini, M. (1996) *Nature* **383** (6599), 400

¹²⁹ Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. and Springer, T. A. (1996) *Nature* **382** (6594), 829-833

¹³⁰ Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., Loetscher, M., Baggiolini, M. and Moser, B. (1996) *Nature* **382** (6594), 833-835

¹³¹ Castagna, A., Biswas, P., Beretta, A. and Lazzarin, A. (2005) *Drugs* **65** (7), 879-904

¹³² Dragic, T., Trkola, A., Thompson, D. A., Cormier, E. G., Kajumo, F. A., Maxwell, E., Lin, S. W., Ying, W., Smith, S. O., Sakmar, T. P. and Moore, J. P. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (10), 5639-5644

¹³³ Tsamis, F., Gavrillo, S., Kajumo, F., Seibert, C., Kuhmann, S., Ketas, T., Trkola, A., Palani, A., Clader, J. W., Tagat, J. R., McCombie, S., Baroudy, B., Moore, J. P., Sakmar, T. P. and Dragic, T. (2003) *J Virol* **77** (9), 5201-5208

¹³⁴ Seibert, C., Ying, W., Gavrillo, S., Tsamis, F., Kuhmann, S. E., Palani, A., Tagat, J. R., Clader, J. W., McCombie, S. W., Baroudy, B. M., Smith, S. O., Dragic, T., Moore, J. P. and Sakmar, T. P. (2006) *Virology* **349** (1), 41-54

jours avec l'UK-427857 induisait une conversion phénotypique pour seulement deux des 63 patients recevant le traitement, ce qui pourrait en faire un bon candidat. Des études sont, néanmoins, en cours pour suivre les patients sur une plus longue période.

Plusieurs antagonistes de CXCR4 ont également été étudiés, notamment le KRH-2731 et l'AMD3100, un membre de la famille des bicyclames, remplacé par un composé de seconde génération, l'AMD070, de plus faible poids moléculaire et moins toxique¹³⁵. Ces molécules ont la propriété d'être très cationiques et de pouvoir se fixer sur les régions anioniques de CXCR4. Les conséquences du blocage de CXCR4 doivent néanmoins être évaluées puisque l'absence de ce récepteur à la surface cellulaire est associée à différentes pathologies^{136,137,138}.

Des **anticorps** monoclonaux dirigés contre les corécepteurs ont également été utilisés pour tenter de limiter l'entrée du virus. Bien que l'anticorps 12G5 dirigé contre CXCR4 ait montré une activité inhibitrice contre les souches X4, son efficacité présente certaines limites. Cette faiblesse est probablement liée aux différentes configurations de présentation de CXCR4 et donc de ses épitopes, à la surface des différentes cellules CD4+¹³⁹. Parmi les nombreux anticorps monoclonaux produits contre le récepteur CCR5, seuls deux (2D7 et PA14 ou PRO140) ont montré à la fois un effet inhibiteur sur la liaison de gp120 sur CCR5 et une action anti-fusogénique¹⁴⁰.

In vivo, et de façon naturelle, les **chimiokines** peuvent bloquer l'infection du VIH par différents mécanismes, principalement par gêne stérique et/ou en provoquant l'endocytose de leur récepteur associé^{141,142,143}. *In vitro*, un certain nombre de chimiokines modifiées (AOP-RANTES, NNY-RANTES, RANTES 9-68, RANTES 3-68, Met-RANTES) ont été développées contre CCR5. Cependant, des problèmes de pharmacocinétique, d'interférence avec la physiologie, d'apparition de souches résistantes et de coût de production rendent leur développement clinique très incertain.

¹³⁵ Donzella, G. A., Schols, D., Lin, S. W., Este, J. A., Nagashima, K. A., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Henson, G., De Clercq, E. and Moore, J. P. (1998) *Nat Med* **4** (1), 72-77

¹³⁶ Ara, T., Itoi, M., Kawabata, K., Egawa, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Fujii, N., Amagai, T. and Nagasawa, T. (2003) *J Immunol* **170** (9), 4649-4655

¹³⁷ Plotkin, J., Prockop, S. E., Lepique, A. and Petrie, H. T. (2003) *J Immunol* **171** (9), 4521-4527

¹³⁸ Odemis, V., Lamp, E., Pezeshki, G., Moepps, B., Schilling, K., Gierschik, P., Littman, D. R. and Engele, J. (2005) *Mol Cell Neurosci* **30** (4), 494-505

¹³⁹ McKnight, A., Wilkinson, D., Simmons, G., Talbot, S., Picard, L., Ahuja, M., Marsh, M., Hoxie, J. A. and Clapham, P. R. (1997) *J Virol* **71** (2), 1692-1696

¹⁴⁰ Olson, W. C., Rabut, G. E., Nagashima, K. A., Tran, D. N., Anselma, D. J., Monard, S. P., Segal, J. P., Thompson, D. A., Kajumo, F., Guo, Y., Moore, J. P., Maddon, P. J. and Dragic, T. (1999) *J Virol* **73** (5), 4145-4155

¹⁴¹ Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. and Lusso, P. (1995) *Science* **270** (5243), 1811-1815

¹⁴² Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. and Springer, T. A. (1996) *Nature* **382** (6594), 829-833

¹⁴³ Amara, A., Gall, S. L., Schwartz, O., Salamero, J., Montes, M., Loetscher, P., Baggiolini, M., Virelizier, J. L. and Arenzana-Seisdedos, F. (1997) *J Exp Med* **186** (1), 139-146

❖ Inhibiteurs de la fusion

La molécule T-20 (Enfuvirtide ou Fuzéon) est actuellement le seul inhibiteur de fusion approuvé par la FDA (2003), pour le traitement de l'infection par le VIH¹⁴⁴. Il est administré, de façon sous-cutanée, en combinaison avec d'autres agents antirétroviraux. Ce composé est une petite molécule de 36 acides aminés mimant la région C-HR de gp41 et se fixant sur sa région N-HR^{145,146}. Cette liaison empêche le repliement de gp41 et la formation du pore de fusion (cf II-1.3.2.). La sensibilité au T-20 dépend principalement de l'affinité du virus pour les récepteurs et corécepteurs à la surface cellulaire : lorsque la fusion se fait rapidement, le T-20 diminue en efficacité¹⁴⁷. La prise de ce médicament entraîne, néanmoins, la génération de virus résistants.

Le T-1249 (Tifuvirtide) est un peptide de fusion de seconde génération, similaire au T-20, actif contre le VIH-1, le VIH-2 et le VIS (Virus de l'Immunodéficience Simienne) mais aussi contre les virus résistants au T-20^{148,149}. Cependant, son développement a été suspendu à cause de difficultés de production¹⁵⁰.

Inhibiteur d'entrée	Type	Cible	Formulation	Essais	Société
Dextrine-2-sulfate	molécule	gp120	gel vaginal	phase II	ML Laboratories
PRO 542	dérivé d'anticorps	gp120	injection intraveineuse	phase II	Progenics
TNX 355	dérivé d'anticorps	CD4	injection intraveineuse	phase II	Tanox
BMS-488043	molécule	gp120/CD4	administration orale	phase II	Bristol Myers Squibb
SCH-D	molécule	CCR5	administration orale	phase II	Shering-Plough
UK-427857	molécule	CCR5	administration orale	phase II	Pfizer
GSK-873140	molécule	CCR5	administration orale	phase II	GlaxoSmithKline
PA 14 (PRO 140)	anticorps	CCR5	injection	stade préclinique	Progenics
TAK-220	molécule	CCR5	administration orale	stade préclinique	Takeda
AMD-887	molécule	CCR5	administration orale	stade préclinique	AnorMED
AMD-070	molécule	CXCR4	administration orale	stade préclinique	AnorMED
KRH-2731	molécule	CXCR4	administration orale	stade préclinique	Kureha
Enfuvirtide (T-20)	peptide	gp41	injection sous-cutanée	disponible dans le commerce	Trimeris/Roche
Tifuvirtide (T-1249)	peptide	gp41	injection sous-cutanée	Arrêt après la phase I/II	Trimeris/Roche

Tableau III : les différents inhibiteurs de l'entrée virale¹⁵¹

¹⁴⁴ Chen, C. H., Matthews, T. J., McDanal, C. B., Bolognesi, D. P. and Greenberg, M. L. (1995) *J Virol* **69** (6), 3771-3777

¹⁴⁵ Cooley, L. A. and Lewin, S. R. (2003) *J Clin Virol* **26** (2), 121-132

¹⁴⁶ Moore, J. P. and Doms, R. W. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (19), 10598-10602

¹⁴⁷ Reeves, J. D., Gallo, S. A., Ahmad, N., Miamidian, J. L., Harvey, P. E., Sharron, M., Pohlmann, S., Sfakianos, J. N., Derdeyn, C. A., Blumenthal, R., Hunter, E. and Doms, R. W. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A*

¹⁴⁸ Eron, J. J., Gulick, R. M., Bartlett, J. A., Merigan, T., Arduino, R., Kilby, J. M., Yangco, B., Diers, A., Drobnies, C., DeMasi, R., Greenberg, M., Melby, T., Raskino, C., Rusnak, P., Zhang, Y., Spence, R. and Miralles, G. D. (2004) *J Infect Dis* **189** (6), 1075-1083

¹⁴⁹ Lalezari, J. P., Bellos, N. C., Sathasivam, K., Richmond, G. J., Cohen, C. J., Myers, R. A., Jr., Henry, D. H., Raskino, C., Melby, T., Murchison, H., Zhang, Y., Spence, R., Greenberg, M. L., Demasi, R. A. and Miralles, G. D. (2005) *J Infect Dis* **191** (7), 1155-1163

¹⁵⁰ Martin-Carbonero, L. (2004) *AIDS Rev* **6** (1), 61

¹⁵¹ Castagna, A., Biswas, P., Beretta, A. and Lazzarin, A. (2005) *Drugs* **65** (7), 879-904

Malgré la forte activité antivirale *in vitro* et parfois *in vivo* de ces inhibiteurs, il subsiste encore de nombreuses contraintes à contourner avant leur utilisation. La biodisponibilité, la pharmacocinétique, la toxicité et les coûts de production sont autant de paramètres qui devront être évalués avec attention avant l'application de ces composés dans un but thérapeutique. Des études visant l'inhibition de l'entrée virale par multithérapie sont en cours pour déterminer les effets synergiques de certains inhibiteurs (de fusion et des corécepteurs, par exemple).

Plusieurs de ces composés ont été développés en qualité de **microbicides**. Le terme “microbicide” indique une gamme de produits qui vise à prévenir l'infection par le VIH et par d'autres pathogènes sexuellement transmissibles lorsqu'ils sont appliqués sur les muqueuses génitales. A l'origine, le terme de microbicide s'appliquait pour des substances qui permettent de tuer un microorganisme. Depuis, il a été étendu, dans le cas de l'infection par le VIH, à toutes les molécules qui, en application locale, permettent d'inhiber la transmission du virus. On dénombre six mécanismes par lesquels une substance peut jouer un rôle microbicide :

- Dégradation ou inactivation des agents pathogènes, en détruisant la surface, ou l'enveloppe du virus, par exemple. Le principe actif est, dans ce cas, constitué d'agents surfactants capables de disloquer les membranes non-ioniques.
- Création de barrières physiques pour protéger les cellules épithéliales des muqueuses.
- Renforcement des défenses naturelles de l'organisme. *Lactobacillus* est une bactérie qui contribue à l'acidité du pH vaginal. Cette acidité naturelle rend le vagin inhospitalier pour la plupart des pathogènes, y compris le VIH. Cependant, la présence de sperme change momentanément le pH vaginal et peut permettre une infection. Des produits qui, soit en augmentant la présence de *Lactobacillus*, soit par d'autres moyens, maintiennent l'acidité vaginale même en présence de sperme, pourraient empêcher l'infection par le VIH.
- Blocage de l'adsorption du virus sur sa cellule cible. Certains microbicides inhibent la fixation du virus par l'intermédiaire de polysulfates chargés négativement qui vont se fixer à gp120, bloquant ainsi l'entrée du virus dans la cellule hôte¹⁵². Plusieurs microbicides ont été développés sur la base de polymères sulfatés : le poly(styrène 4-sulfonate) (T-PSS), le sulfate de cellulose (CS), le polyméthylènehydroquinone (PMHS), le PRO 2000 et un dérivé des carraghénanes, polysaccharides issus des algues rouges (le Carraguard). Il semble que ces

¹⁵² Scordi-Bello, I. A., Mosoian, A., He, C., Chen, Y., Cheng, Y., Jarvis, G. A., Keller, M. J., Hogarty, K., Waller, D. P., Profy, A. T., Herold, B. C. and Klotman, M. E. (2005) *Antimicrob Agents Chemother* **49** (9), 3607-3615

polysaccharides inhibent les souches R5 de la même façon que les isolats X4^{153,154} (cf III-3.3.2.).

- Blocage de l'interaction gp120/CD4 et corécepteurs. Le sCD4-17b, constitué d'un fragment soluble de CD4 couplé à une partie de l'anticorps 17b, dirigé contre le site de fixation aux corécepteurs de gp120, permet à la fois de bloquer la fixation de gp120 sur CD4 et sur CXCR4 ou CCR5¹⁵⁵.

- Blocage de la réplication virale. Certains microbicides sont issus de la recherche sur des agents antirétroviraux qui n'ont pas pu être développés comme médicament du fait de leur biodisponibilité réduite mais qui sont appropriés en utilisation locale.

Onze produits avec différentes cibles et différents mécanismes sont actuellement en cours d'essais cliniques. Cependant, même s'ils passent le cap de ces essais, aucun produit ne sera un microbicide "réponse à tous problèmes". Il est impératif que des molécules qui agissent différemment soient testées simultanément afin de maximiser la probabilité de trouver un composé efficace.

I-4.3. Les autres cibles

L'**intégrase** est une molécule spécifique aux virus qui permet à l'ADN viral de s'intégrer dans l'ADN génomique cellulaire, un phénomène crucial pour la persistance du virus. Le S-1360, premier inhibiteur de l'intégrase, est actuellement en études cliniques de phase II¹⁵⁶. D'autres composés de la même classe font également l'objet d'études dont le PL-2500 et les styrylquinolines¹⁵⁷. Néanmoins, une étude a récemment montré que le VIH développe plusieurs mutations résistantes contre le S-1360¹⁵⁸.

Récemment, les recherches d'inhibiteurs de l'infection VIH se sont orientées vers le blocage de l'étape finale du cycle réplcatif du virus : le **bourgeonnement** du virus à partir de la membrane de la cellule infectée. Par exemple, GPG-NH2 est un tripeptide qui bloque la formation de la capsid virale en interférant avec l'assemblage des protéines p24 au cours du bourgeonnement et de la maturation des virus¹⁵⁹.

¹⁵³ Scordi-Bello, I. A., Mosoian, A., He, C., Chen, Y., Cheng, Y., Jarvis, G. A., Keller, M. J., Hogarty, K., Waller, D. P., Profy, A. T., Herold, B. C. and Klotman, M. E. (2005) *Antimicrob Agents Chemother* **49** (9), 3607-3615

¹⁵⁴ Neurath, A. R., Strick, N. and Li, Y. Y. (2002) *BMC Infect Dis* **2**, 27

¹⁵⁵ Dey, B., Del Castillo, C. S. and Berger, E. A. (2003) *J Virol* **77** (5), 2859-2865

¹⁵⁶ Billich, A. (2003) *Curr Opin Investig Drugs* **4** (2), 206-209

¹⁵⁷ Zouhiri, F., Mouscadet, J. F., Mekouar, K., Desmaele, D., Savoure, D., Leh, H., Subra, F., Le Bret, M., Auclair, C. and d'Angelo, J. (2000) *J Med Chem* **43** (8), 1533-1540

¹⁵⁸ Fikkert, V., Hombrouck, A., Van Remoortel, B., De Maeyer, M., Pannecouque, C., De Clercq, E., Debyser, Z. and Witvrouw, M. (2004) *Aids* **18** (15), 2019-2028

¹⁵⁹ Hoglund, S., Su, J., Reneby, S. S., Vegvari, A., Hjerten, S., Sintorn, I. M., Foster, H., Wu, Y. P., Nystrom, I. and Vahlne, A. (2002) *Antimicrob Agents Chemother* **46** (11), 3597-3605

Les **cytokines** sont des protéines produites par différentes cellules du système immunitaire (principalement les lymphocytes T), permettant d'activer d'autres cellules qui vont souvent, à leur tour, exprimer différentes cytokines. De nombreuses études ont montré que l'infection initiale par le VIH altère la balance normale des cytokines et induit une augmentation du taux de certaines d'entre elles, notamment de l'IFN γ et des interleukines 2 et 12 (IL-2 et IL-12). Lorsque la maladie progresse vers le stade du SIDA, la production de ces cytokines diminue, au profit d'un autre groupe constitué principalement par l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et le TNF- α . Ces cytokines sont suspectées d'être à l'origine de nombreuses pathologies liées au SIDA (lymphomes, problèmes neurologiques, démence...).

Ces données ont conduit certains laboratoires à étudier des traitements qui pourraient corriger ce déséquilibre, d'une part en stimulant le système immunitaire et donc les cytokines favorables à la lutte contre le VIH et, d'autre part, en réduisant les autres. Les difficultés rencontrées résident dans le fait que les voies de signalisation induites par ces cytokines sont inter-dépendantes et que des changements dans le taux d'une cytokine affectent l'expression des autres.

A l'heure actuelle, les principaux résultats d'immunothérapie ont été obtenus avec l'IL-2. Il s'agit d'une cytokine principalement produite par les lymphocytes T activés. Elle agit sur leur multiplication cellulaire et induit une synthèse accrue d'autres cytokines. Elle active aussi les lymphocytes de type NK en augmentant leur potentiel de destruction de cellules et agit sur leur prolifération, comme sur celle des lymphocytes B. La synthèse d'anticorps par les lymphocytes B est stimulée par l'IL-2. Ces effets participent à la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Chez les personnes vivant avec le VIH et traitées par des antirétroviraux, l'administration d'IL-2 recombinante entraîne une augmentation du nombre de lymphocytes CD4¹⁶⁰. Cet effet est dû à une prolifération accrue et à une prolongation de la durée de vie de ces cellules. Cependant, plus le système immunitaire est atteint, moins l'IL-2 est efficace. De fortes doses d'IL-2 peuvent, en revanche, entraîner la production de TNF- α et d'IL-6 et augmenter le taux de virus dans le sang en stimulant les lymphocytes T au repos, qui vont, à leur tour, produire des virus, jusqu'alors latents.

¹⁶⁰ Abrams, D. I., Bebhuk, J. D., Denning, E. T., Davey, R. T., Fox, L., Lane, H. C., Sampson, J., Verheggen, R., Zeh, D. and Markowitz, N. P. (2002) *J Acquir Immune Defic Syndr* **29** (3), 221-231

L'interférence ARN (ARNi) est un processus dont se servent couramment les invertébrés pour empêcher l'expression de certains gènes¹⁶¹. Des études récentes indiquent que le VIH peut être bloqué si certains de ses gènes sont spécifiquement éteints. La plupart des gènes du VIH ont été inhibés, *in vitro*. C'est, par exemple, le cas de *tat*, *rev*, *gag*, *pol*, *nef*, *vif*, *env*, *vpr*^{162,163,164,165,166}. Certaines enzymes du VIH, telles que la transcriptase inverse, ont également été ciblées¹⁶⁷. Malgré ces premiers succès, l'application clinique de cette méthode reste un challenge du fait du fort taux de mutation du VIH^{168,169,170}. Pour pallier ces inconvénients, des stratégies alternatives visant à éteindre directement les récepteurs du VIH ont été développées : certaines études ont visé CD4¹⁶⁶, CCR5 et/ou CXCR4¹⁷¹ et DC-SIGN^{172,173}. Viser CCR5 semble, en particulier, être une approche prometteuse puisque ce récepteur n'est pas essentiel à l'organisme. En revanche, le fait d'inhiber CD4 ou CXCR4 pourrait avoir des conséquences physiologiques importantes.

Une autre difficulté réside dans le ciblage des cellules infectées. En effet, les ARNi synthétiques ont un temps de demi-vie relativement court et devraient, de ce fait, être administrés de façon répétitive pendant des années pour traiter l'infection de façon efficace. Une approche potentielle vise à isoler des lymphocytes T de patients, leur injecter des molécules d'ARNi par transduction, les cultiver puis les réintroduire dans l'organisme. De nombreux essais cliniques ont été effectués sur la transduction *ex vivo* de lymphocytes T, *via* un vecteur lentiviral codant pour un ARN antisens anti-VIH¹⁷⁴.

I-4.4. Les vaccins

Peu après l'identification du VIH comme l'agent responsable du SIDA, l'espoir était grand de pouvoir aboutir assez rapidement à un vaccin. Les premières études sur un vaccin contre le VIH ont été conduites dès 1987. Depuis cette date, plus de 80 essais de phase I et II ont été réalisés, avec environ trente candidats-vaccins différents. Mais à l'heure actuelle, l'approche vaccinale reste très limitée par l'importance des mutations génétiques du virus.

¹⁶¹ Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) *Nature* **391** (6669), 806-811

¹⁶² Coburn, G. A. and Cullen, B. R. (2002) *J Virol* **76** (18), 9225-9231

¹⁶³ Jacque, J. M., Triques, K. and Stevenson, M. (2002) *Nature* **418** (6896), 435-438

¹⁶⁴ Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A., Salvaterra, P. and Rossi, J. (2002) *Nat Biotechnol* **20** (5), 500-505

¹⁶⁵ Martinez, M. A., Clotet, B. and Este, J. A. (2002) *Trends Immunol* **23** (12), 559-561

¹⁶⁶ Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P. and Sharp, P. A. (2002) *Nat Med* **8** (7), 681-686

¹⁶⁷ Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E. and Looney, D. J. (2004) *Science* **305** (5688), 1289-1292

¹⁶⁸ Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L. and Ramratnam, B. (2003) *J Virol* **77** (21), 11531-11535

¹⁶⁹ Westerhout, E. M., Ooms, M., Vink, M., Das, A. T. and Berkhout, B. (2005) *Nucleic Acids Res* **33** (2), 796-804

¹⁷⁰ Sabariego, R., Gimenez-Barcons, M., Tapia, N., Clotet, B. and Martinez, M. A. (2006) *J Virol* **80** (2), 571-577

¹⁷¹ Anderson, J. and Akkina, R. (2005) *Retrovirology* **2**, 53

¹⁷² Steinman, R. M. (2000) *Cell* **100** (5), 491-494

¹⁷³ Nair, M. P., Reynolds, J. L., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Aalink, R., Bindukumar, B. and Sykes, D. (2005) *Aaps J* **7** (3), E572-578

¹⁷⁴ Dropulic, B. (2001) *Mol Ther* **4** (6), 511-512

L'approche la plus fructueuse pour les autres maladies – les vaccins vivants atténués (notamment dans le cas du VIH sans la protéine nef^{175,176,177,178}) – est peu susceptible de servir au développement d'un vaccin anti-VIH et donne des résultats peu concluants¹⁷⁹. De plus, l'utilisation de virus inactivés ou atténués, du fait des capacités de mutation du VIH, entraîne le risque qu'une forme active du virus réapparaisse. D'autres parades doivent donc être trouvées pour bloquer ce virus (figure 6).

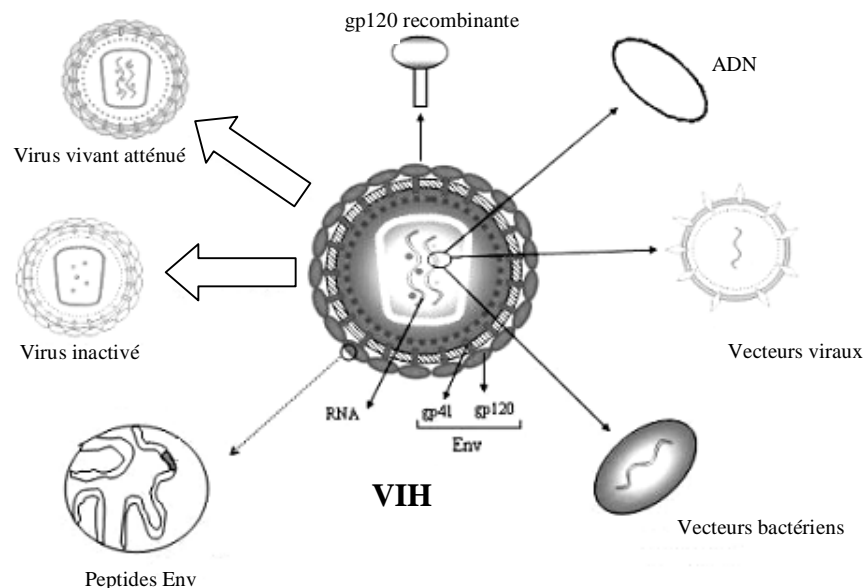


Figure 6 : stratégies vaccinales développées contre le VIH¹⁸⁰

Les recherches visant à établir un vaccin contre le VIH ont étudié différentes stratégies : l'utilisation de virus inactivés ou atténués, l'utilisation de fragments de protéines virales (en particulier gp120) pour stimuler la production d'anticorps neutralisants, l'injection de fragments de gènes viraux de façon directe (vaccins à ADN nu) ou *via* des vecteurs viraux recombinants ou des vecteur bactériens.

La première stratégie développée pour créer un vaccin contre le VIH consiste à utiliser des fragments de protéines virales afin de **stimuler la production d'anticorps neutralisants**. Ces protéines virales sont souvent des protéines d'enveloppe et de nombreux essais ont été entrepris avec gp120. Un tel vaccin, développé par la compagnie VaxGen, est notamment entré en phase III d'essais cliniques aux USA et en Thaïlande, mais, n'a, à ce stade, montré aucun effet contre une infection par le VIH^{181,182}. Le problème est dû à la structure même de

¹⁷⁵ Connor, R. I., Montefiori, D. C., Binley, J. M., Moore, J. P., Bonhoeffer, S., Gettie, A., Fenamore, E. A., Sheridan, K. E., Ho, D. D., Dailey, P. J. and Marx, P. A. (1998) *J Virol* **72** (9), 7501-7509

¹⁷⁶ Ruprecht, R. M., Baba, T. W. and Liska, V. (1996) *Science* **271** (5257), 1790-1792

¹⁷⁷ Ruprecht, R. M., Baba, T. W., Liska, V., Bronson, R., Penninck, D. and Greene, M. F. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* **12** (5), 459-460

¹⁷⁸ Ruprecht, R. M., Hu, Y., Liska, V., Rasmussen, R. and Sharma, P. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* **12** (5), 375-377

¹⁷⁹ Whitney, J. B. and Ruprecht, R. M. (2004) *Curr Opin Infect Dis* **17** (1), 17-26

¹⁸⁰ Singh, M. (2006) *Virol J* **3**, 60

¹⁸¹ Desrosiers, R. C. (2004) *Nat Med* **10** (3), 221-223

¹⁸² Pitisuttithum, P., Berman, P. W., Phonrat, B., Suntharasamai, P., Raktham, S., Srisuwanvilai, L. O., Hirunras, K., Kitayaporn, D., Kaewkangwal, J., Migasena, S., Sheppard, H. W., Li, E., Chernow, M., Peterson, M. L., Shibata, R., Heyward, W. L. and Francis, D. P. (2004) *J Acquir Immune Defic Syndr* **37** (1), 1160-1165

gp120, puisque la majorité de la surface de gp120 est masquée par des glycosylations et est, de ce fait, très peu accessible aux anticorps. Elle est constituée de boucles hypervariables et les régions conservées sont profondément enfouies au cœur de la structure oligomérique (cf II-1.2.). Notamment, le site de liaison à CD4, extrêmement conservé d'une souche à une autre, est bien masqué et le site de liaison aux corécepteurs se forme uniquement à la suite de changements conformationnels dus à la liaison avec CD4¹⁸³.

La deuxième stratégie dans la recherche vaccinale consiste à **stimuler les lymphocytes T** tueurs, cellules du système immunitaire capables de détruire les cellules infectées avant qu'elles ne propagent l'infection. Pour cela, le vaccin doit apporter des « signes de reconnaissance » du virus d'une façon particulière : les fragments de virus doivent pénétrer à l'intérieur des cellules afin qu'elles miment les cellules infectées. Plusieurs possibilités sont développées : des portions de matériel génétique du virus peuvent être injectées à l'organisme. Ce sont les vaccins « ADN nu ». Les cellules qui intègrent cet ADN peuvent alors synthétiser la protéine ou le peptide correspondant à l'ADN injecté puis le présenter aux cellules tueuses, comme elles l'auraient fait si elles contenaient du virus. Des plasmides ADN contenant le gène *gag* du VIH ainsi que les gènes codant pour l'IL-12 ou l'IL-15 sont, en particulier, en phase I d'essais cliniques.

Une autre astuce pour mimer l'infection consiste à faire entrer des fragments de gènes du VIH dans un vecteur viral ou bactérien recombinant. Initialement, le virus de la vaccine a été développé en tant que vecteur, mais des considérations sanitaires ont poussé à chercher d'autres vecteurs. Un vecteur basé sur le virus canarypox (ALVAC) a été développé par Sanofi-Pasteur et est actuellement en phase III d'essais cliniques, en Thaïlande. La phase de vaccination sur 16000 volontaires s'est achevée en juillet 2006 et les résultats de l'essai sont prévus pour le milieu de l'année 2009. De même, le virus de la vaccine modifié Ankara (MVA) est étudié en essais de phase I/II. Les vecteurs basés sur l'adénovirus de type 5 représentent la stratégie la plus prometteuse à l'heure actuelle^{184,185}. La liste des virus recombinants à l'étude est longue : le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus Sendai, les virus associés aux adénovirus (AAV)...

¹⁸³ Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. and Harrison, S. C. (2005) *Nature* **433** (7028), 834-841

¹⁸⁴ Casimiro, D. R., Bett, A. J., Fu, T. M., Davies, M. E., Tang, A., Wilson, K. A., Chen, M., Long, R., McKelvey, T., Chastain, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., Emini, E. A. and Shiver, J. (2004) *J Virol* **78** (20), 11434-11438

¹⁸⁵ Shiver, J. W. and Emini, E. A. (2004) *Annu Rev Med* **55**, 355-372

En parallèle, des vecteurs un peu particuliers ont été développés : un vecteur basé sur le vaccin BCG^{186,187} ou un vecteur créé à partir de salmonelles atténuées¹⁸⁸.

Depuis 1994, l'ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA) développe une stratégie vaccinale visant à induire une réponse cellulaire multiépitopique par l'administration de lipopeptides. Il s'agit de molécules hybrides constituées de larges fragments synthétiques de protéines virales associés de façon covalente à une chaîne lipidique monopalmitoylée. Ces constructions permettent d'accroître l'immunogénicité sans recours à un adjuvant. La partie lipidique assure une meilleure pénétration intracellulaire du peptide dans les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques), favorisant ainsi la réponse immunitaire cellulaire. Une première étude *in vivo* réalisée chez la souris a permis de démontrer le potentiel immunogène des lipopeptides¹⁸⁹. Un mécanisme de l'induction d'une réponse cellulaire T par les lipopeptides a récemment été suggéré¹⁹⁰. Les lipopeptides induisent donc des réponses cellulaires T fortes, multiépitopiques, de longue durée (plus de 2 ans) et reproductibles chez un nombre significatif de sujets vaccinés. Les lipopeptides sont bien tolérés : les réactions locales et systémiques, faibles et de courte durée dans ces essais, sont semblables à celles induites par d'autres candidats vaccins étudiés dans le monde.

Les vaccins détaillés ici seraient des vaccins de première génération, d'efficacité partielle. Ils n'empêcheraient pas l'infection mais diminueraient la charge virale au cours de la primo-infection et assureraient un bénéfice individuel important en permettant une longue période d'évolution asymptomatique de la maladie. À l'échelle individuelle et des populations, ils pourraient permettre de diminuer le recours aux antirétroviraux pendant plusieurs années, pour de nombreuses personnes atteintes. De plus, en diminuant la charge virale moyenne dans la population, la vaccination aurait un effet sur la transmissibilité du VIH et donc un impact en santé publique.

¹⁸⁶ Ami, Y., Izumi, Y., Matsuo, K., Someya, K., Kanekiyo, M., Horibata, S., Yoshino, N., Sakai, K., Shinohara, K., Matsumoto, S., Yamada, T., Yamazaki, S., Yamamoto, N. and Honda, M. (2005) *J Virol* **79** (20), 12871-12879

¹⁸⁷ Someya, K., Cecilia, D., Ami, Y., Nakasone, T., Matsuo, K., Burda, S., Yamamoto, H., Yoshino, N., Kaizu, M., Ando, S., Okuda, K., Zolla-Pazner, S., Yamazaki, S., Yamamoto, N. and Honda, M. (2005) *J Virol* **79** (3), 1452-1462

¹⁸⁸ Devico, A. L., Fouts, T. R., Shata, M. T., Kamin-Lewis, R., Lewis, G. K. and Hone, D. M. (2002) *Vaccine* **20** (15), 1968-1974

¹⁸⁹ Martinon, F., Gras-Masse, H., Boutillon, C., Chirat, F., Deprez, B., Guillet, J. G., Gomard, E., Tartar, A. and Levy, J. P. (1992) *J Immunol* **149** (10), 3416-3422

¹⁹⁰ Andrieu, M., Desoutter, J. F., Loing, E., Gaston, J., Hanau, D., Guillet, J. G. and Hosmalin, A. (2003) *J Virol* **77** (2), 1564-1570

II- MECANISME DE L'ENTREE VIRALE

Le VIH possède, à sa surface, des complexes protéiques, appelés env, formés par l'association non covalente d'un trimère de glycoprotéines gp120 et gp41. L'entrée du VIH dans une cellule hôte dépend de l'interaction préalable de ces protéines virales avec des récepteurs CD4 puis des récepteurs à chimiokines (principalement CXCR4 ou CCR5). Cette étape peut être précédée par une étape d'attachement du virus à la surface cellulaire. Dans ce cas, le VIH interagit avec un récepteur dit « d'attachement » (par exemple des MBL (*Mannose Binding Lectins*), LFA-1, DC-SIGN, des héparanes sulfate...) qui, souvent, facilite l'interaction ultérieure avec les récepteurs d'entrée (cf II-2.3.).

II-1. Le complexe Env

Le complexe glycoprotéique Env est constitué de deux protéines : gp120, une glycoprotéine de surface responsable de l'attachement du virus sur les récepteurs cellulaires et gp41, une glycoprotéine transmembranaire qui dirige la fusion des membranes virale et cellulaire (figure 7).

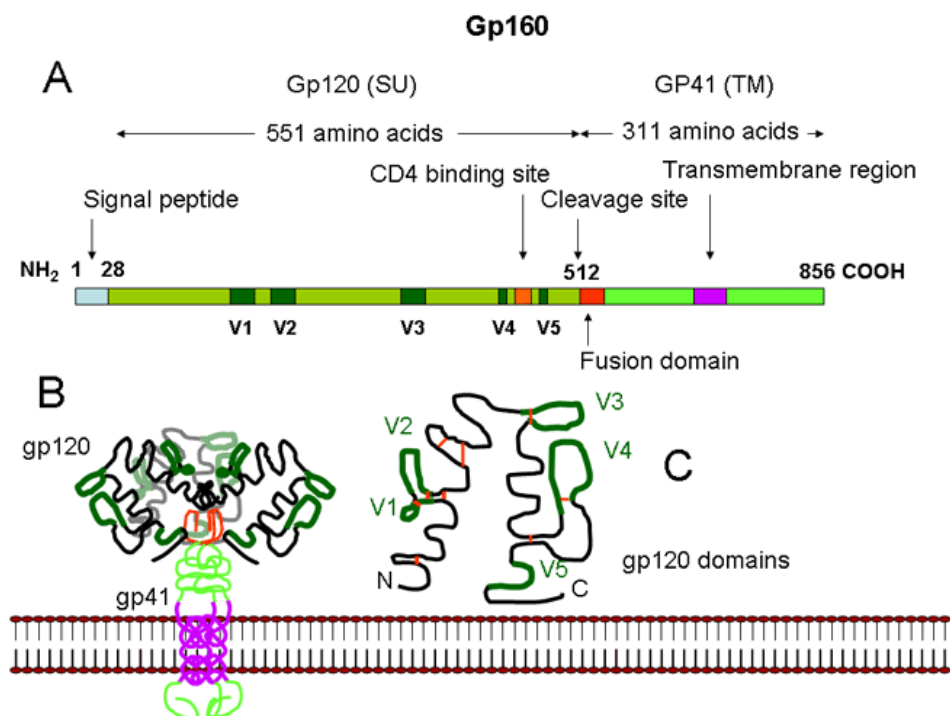


Figure 7 : représentation schématique des différents domaines du complexe Env

(A) Le précurseur gp160 est clivé en deux protéines : gp120 et gp41. La protéine gp120 porte les domaines de fixation à CD4 et aux corécepteurs. La protéine gp41 est une protéine transmembranaire qui porte le domaine de fusion. (B) Les protéines gp120 et gp41, chacune sous forme trimérique, s'organisent en complexe à la surface du virus. (C) gp120 est constituée de 5 régions variables et 5 domaines constants ; les 4 premières régions variables forment des boucles, structurées par des ponts disulfures.

Source : <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/hiv9.htm>

II-1.1. Biosynthèse et clivage endoprotéolytique du précurseur gp160

Le précurseur gp160 est synthétisé dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'une protéine de 90 kDa, puis glycosylé dans l'appareil de Golgi, par addition de 31 chaînes oligosaccharidiques riches en mannose sur certains résidus Asn des sites de glycosylation Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr¹⁹¹. Les glycosylations de gp160 représentent environ 50% de la masse totale de la protéine. Elles sont essentielles à la maturation de gp160 puisque le précurseur non glycosylé est incapable de quitter le réticulum endoplasmique et ne subit donc pas de clivage^{192,193}. Des études biochimiques ont permis de montrer que le passage de gp160 du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi est lié à l'oligomérisation de gp160 sous forme de trimère¹⁹⁴.

Ces étapes sont réalisées conjointement au processus de clivage de gp160 en une protéine transmembranaire (gp41) et une protéine de surface (gp120). Plusieurs enzymes, certaines appartenant à la famille des convertases, participent au clivage de gp160. En particulier, la furine et PC7 semblent impliquées dans la maturation de gp160 dans les lymphocytes T¹⁹⁵. Il s'agit de protéinases à sérine, de la famille de la subtilisine. Le site de clivage (site 2) a été identifié^{196,197} : il s'agit du site en aval de la séquence Arg508-Gln-Lys-Arg511, située dans la partie C-terminale de gp120. Cette séquence est fortement conservée parmi les différentes souches de VIH¹⁹⁸ et inclut un des domaines de gp120 les plus conservés (la région C5). L'importance de cette séquence dans l'infection a été démontrée par mutagenèse dirigée. La mutation de Arg511 induit la formation de particules virales non infectieuses possédant des protéines gp160 non matures¹⁹⁶. Il existe un second site de clivage (site 1), situé 8 acides aminés en amont du site de clivage physiologique. Néanmoins, le clivage au niveau de ce site conduit à la formation de protéines gp41 non fusogènes. La signification physiologique de ce second site de clivage est, à l'heure actuelle, encore mal connue ; il s'agit cependant d'un processus non négligeable puisque 15% des protéines gp41 possèdent cette séquence¹⁹⁹. Il semblerait que gp160 soit clivée, de façon intracellulaire, au

¹⁹¹ Allan, J. S., Coligan, J. E., Barin, F., McLane, M. F., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Lee, T. H. and Essex, M. (1985) *Science* **228** (4703), 1091-1094

¹⁹² Pal, R., Hoke, G. M. and Sarngadharan, M. G. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (9), 3384-3388

¹⁹³ Vollenweider, F., Benjannet, S., Decroly, E., Savaria, D., Lazure, C., Thomas, G., Chretien, M. and Seidah, N. G. (1996) *Biochem J* **314** (2), 521-532

¹⁹⁴ Willey, R. L., Bonifacino, J. S., Potts, B. J., Martin, M. A. and Klausner, R. D. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (24), 9580-9584

¹⁹⁵ Decroly, E., Wouters, S., Di Bello, C., Lazure, C., Ruyschaert, J. M. and Seidah, N. G. (1996) *J Biol Chem* **271** (48), 30442-30450

¹⁹⁶ Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W. C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W. and Sodroski, J. (1987) *Science* **237** (4820), 1351-1355

¹⁹⁷ McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R. and Weissman, I. L. (1988) *Cell* **53** (1), 55-67

¹⁹⁸ Veronese, F. D., DeVico, A. L., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Gallo, R. C. and Sarngadharan, M. G. (1985) *Science* **229** (4720), 1402-1405

¹⁹⁹ Fenouillet, E. and Gluckman, J. C. (1992) *Virology* **187** (2), 825-828

niveau du site 2 puis que la partie C-terminale de gp120 interagisse avec la partie N-terminale de gp41 afin de masquer le peptide fusogène²⁰⁰. Une fois à la surface du virus, gp120 interagirait avec CD4, puis avec une protéine (encore inconnue) située à la surface de la cellule hôte, pour être clivée au niveau du site 1. Cette étape permettrait l'induction de l'activité fusogène de gp41.

II-1.2. La protéine gp120

II-1.2.1. Structure

❖ *Structure primaire*

La protéine gp120 est composée d'environ 480 résidus. L'analyse des séquences de différents isolats suggère l'existence de cinq régions conservées (C1 à C5) et de cinq régions (V1 à V5) avec une haute variabilité de séquence (jusqu'à 60 à 80%). Les quatre premières régions variables forment des boucles exposées, reliées, à leur base, par des ponts disulfures²⁰¹. Les régions conservées de gp120 forment des structures discontinues importantes dans les interactions avec l'ectodomaine de gp41 et les récepteurs viraux, à la surface cellulaire.

❖ *Structures secondaire et tertiaire*

Différents travaux ont permis d'élucider la structure de gp120, en étudiant notamment des fragments de gp120 ou en élaborant des analogies avec la protéine gp120 du VIS.

En 1998, la structure de gp120 (souche IIIB – X4), complexée aux domaines D1/D2 de CD4 et à un fragment Fab de l'anticorps 17b (dirigé contre le site de fixation aux corécepteurs) a été décrite par Kwong *et al.*²⁰². Cette protéine ainsi cristallisée est tronquée en N et C-terminal ; les boucles V1, V2 et V3 ainsi que la majorité des sites de glycosylation ont également été délétés : c'est le « core protéique ». En 2000, la structure du core protéique d'un autre isolat (YU2 – R5) a également été résolue²⁰³. En 2005, la structure du core protéique de gp120 possédant la boucle V3, en complexe avec CD4 et l'anticorps neutralisant X5, a permis de déterminer la structure de V3 et de suggérer son rôle²⁰⁴. En 2005 également,

²⁰⁰ Barbouche, R., Feyfant, E., Belhaj, B. and Fenouillet, E. (2002) *AIDS Res Hum Retroviruses* **18** (3), 201-206

²⁰¹ Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. and Gregory, T. J. (1990) *J Biol Chem* **265** (18), 10373-10382

²⁰² Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

²⁰³ Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (2000) *J Virol* **74** (4), 1961-1972

²⁰⁴ Huang, C. C., Tang, M., Zhang, M. Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R. and Kwong, P. D. (2005) *Science* **310** (5750), 1025-1028

les travaux de Chen *et al.*²⁰⁵ ont permis d'élucider la structure du core de la protéine gp120 du VIS complètement glycosylée et dans sa conformation non liée à CD4. Les protéines gp120 du VIH et du VIS présentent 35% d'identité de séquence et plus de 70% d'homologie de séquence.

En comparant les quatre structures cristallographiques décrites par ces différents travaux ainsi que les données thermodynamiques^{206,207} établies à partir du core protéique de gp120 décrit par Kwong, les changements structuraux intervenant lors de la fixation à CD4 puis aux corécepteurs ont pu être déterminés.

La protéine gp120, non liée à CD4, est très flexible. Elle est organisée en un domaine interne peu homogène, plutôt articulé en un ensemble de structures distinctes, et un domaine externe. Les sites de fixation à CD4 et aux corécepteurs ne sont pas formés et les boucles V1/V2 et V3 sont orientées dans des directions opposées (figure 8A et C). Une ébauche de boucle de fixation à CD4 émerge du domaine externe : associée à une partie du domaine interne, elle forme une longue et étroite cavité bordée de résidus hydrophobes. CD4 interagit avec la région du domaine externe située au creux de cette cavité. Des données thermodynamiques indiquent que, lors de l'interaction avec CD4, gp120 subit un réarrangement global : 126 résidus en moyenne sont réorganisés, la moitié (54) associée à la formation d'un feuillet intermédiaire (ou *bridging sheet*) permettant de séparer les deux domaines²⁰⁶. Les parties N- et C-terminales de gp120 sont réorientées vers la membrane virale alors que le site de fixation aux corécepteurs, CD4i (*CD4-induced*), bordé par les boucles V1/V2 et V3, est créé et orienté vers la membrane cellulaire afin de faciliter l'interaction avec CXCR4 ou CCR5²⁰⁸. Des études montrent que cette conformation CD4-liée est beaucoup plus stable et rigide que la forme libre de gp120^{206,207}. La protéine gp120 complexée à CD4 et 17b est ainsi organisée en deux domaines, interne et externe, mieux structurés, reliés entre eux par le feuillet intermédiaire, constitué de quatre feuillets antiparallèles (figure 8B). Le domaine interne est constitué de deux hélices et d'un feuillet β à cinq segments. Le domaine externe, qui ne subit pas de réarrangements majeurs lors de la fixation à CD4, s'organise en un feuillet β multidirectionnel à six segments qui encadrent une hélice et en un feuillet β antiparallèle à sept segments. Les boucles V1/V2 sont situées au niveau du domaine interne alors que les boucles V4 et V5 se trouvent sur le domaine externe. La structure de gp120 avec la boucle

²⁰⁵ Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. and Harrison, S. C. (2005) *Nature* **433** (7028), 834-841

²⁰⁶ Myszka, D. G., Sweet, R. W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Wyatt, R., Sodroski, J. and Doyle, M. L. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (16), 9026-9031

²⁰⁷ Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessel, A. J., Van Ryk, D., Xiang, S. H., Yang, X., Zhang, M. Y., Zwick, M. B., Arthos, J., Burton, D. R., Dimitrov, D. S., Sodroski, J., Wyatt, R., Nabel, G. J. and Kwong, P. D. (2007) *Nature* **445** (7129), 732-737

²⁰⁸ Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

V3²⁰⁹ suggère que V3 est structurée et dépasse du core en direction de la membrane de la cellule cible. Le domaine interne est mieux conservé d'une souche à l'autre que le domaine externe. Les 7 ponts disulfures sont totalement conservés et enfouis. Les sites de glycosylation sont toujours exposés en surface et assez bien conservés ; ils sont absents du domaine interne et des sites de fixation aux récepteurs. La protéine gp120 entière se comporte globalement de la même façon que la forme tronquée décrite par Kwong²¹⁰.

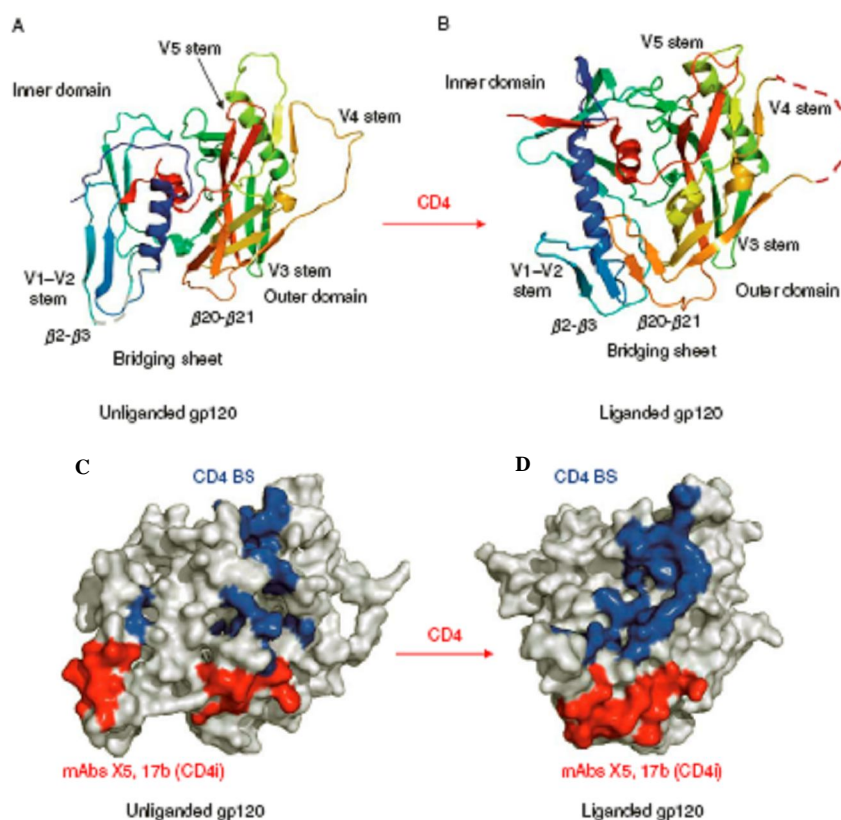


Figure 8 : structure de gp120

(A et B) Structures cristallographiques de gp120 dans son état non lié, ou lié à CD4. (A) Structure du core de la protéine gp120 du VIS non liée à CD4. Les couleurs s'étendent du bleu au rouge pour symboliser la protéine de la partie N-terminale à la partie C-terminale. (B) Structure du core de la protéine gp120 du VIH liée à CD4 et 17b (non représentés sur la figure). Le domaine externe (en vert et jaune) est relativement conservé entre les deux conformations alors que le domaine interne (bleu et cyan) subit des réarrangements majeurs. Le feuillet intermédiaire n'est pas formé en A. (C et D) Modélisation moléculaire du core de gp120 non lié (C) ou lié (D) à CD4. Les résidus directement impliqués dans la fixation à CD4 sont représentés en bleu, ceux impliqués dans la fixation aux anticorps dirigés contre CD4i (17b et X5) sont symbolisés en rouge.

Adapté de ²¹¹

²⁰⁹ Huang, C. C., Tang, M., Zhang, M. Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R. and Kwong, P. D. (2005) *Science* **310** (5750), 1025-1028

²¹⁰ Myszk, D. G., Sweet, R. W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Wyatt, R., Sodroski, J. and Doyle, M. L. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (16), 9026-9031

²¹¹ Prabakaran, P., Dimitrov, A. S., Fouts, T. R. and Dimitrov, D. S. (2007) *Adv Pharmacol* **55**, 33-97

❖ Structure quaternaire

Les premières analyses de la structure du VIH ont révélé que plusieurs spicules, composés chacun de trois exemplaires des protéines virales gp120 et gp41, tapissent l'enveloppe virale^{212,213,214}. Ce modèle est généralement accepté par tous les scientifiques et de nombreux laboratoires ont proposé un modèle de trimérisation de gp120^{215,216,217,218}.

Chen *et al.* proposent un modèle (figure 9) dans lequel les régions riches en N-glycosylations et les boucles hypervariables sont exposées vers l'extérieur du trimère afin de masquer les sites conservés, en particulier le site de fixation à CD4, et d'échapper au système immunitaire. Le site de fixation aux corécepteurs n'est pas formé, mais les éléments du feuillet intermédiaire sont situés à l'intérieur du trimère. Zanetti *et al.*, en revanche, proposent deux modèles : l'un dans lequel le feuillet intermédiaire et la boucle V3 sont situés à l'interface des trois gp120 monomériques et l'autre qui prédit plutôt que ces éléments sont exposés à la surface du trimère, la boucle V3 masquant alors le site de fixation aux corécepteurs. L'orientation relative des monomères au sein de la protéine trimérique semble ainsi, à l'heure actuelle, encore mal définie.

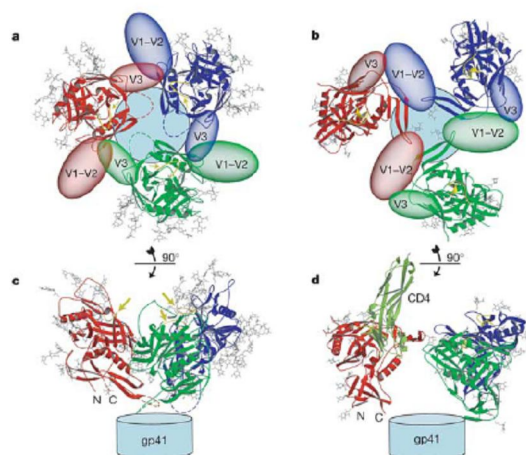


Figure 9 : modèle d'oligomérisation de gp120²¹⁶

(a) Modèle de trimérisation lorsque gp120 est dans son état natif, non lié. Le squelette peptidique est représenté par des rubans, les chaînes glycosylées sont dessinées en gris. Les boucles V1/V2 et V3 ont été déléguées, elles sont schématisées par des ellipses. Les 3 monomères de gp120 sont respectivement représentés en rouge, vert et bleu. La protéine gp41 est schématisée par un cylindre bleu. (b) Modèle de trimérisation lorsque gp120 est liée à CD4 (non représenté). (c) Vue latérale du modèle a. (d) Vue latérale du modèle b. Les deux premiers domaines de CD4 ont été ajoutés (vert clair) sur un des monomères de gp120 seulement.

²¹² Weiss, C. D., Levy, J. A. and White, J. M. (1990) *J Virol* **64** (11), 5674-5677

²¹³ Lu, M., Blacklow, S. C. and Kim, P. S. (1995) *Nat Struct Biol* **2** (12), 1075-1082

²¹⁴ Farzan, M., Choe, H., Desjardins, E., Sun, Y., Kuhn, J., Cao, J., Archambault, D., Kolchinsky, P., Koch, M., Wyatt, R. and Sodroski, J. (1998) *J Virol* **72** (9), 7620-7625

²¹⁵ Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (2000) *J Virol* **74** (4), 1961-1972

²¹⁶ Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. and Harrison, S. C. (2005) *Nature* **433** (7028), 834-841

²¹⁷ Zanetti, G., Briggs, J. A., Grunewald, K., Sattentau, Q. J. and Fuller, S. D. (2006) *PLoS Pathog* **2** (8), e83

²¹⁸ Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A. and Roux, K. H. (2006) *Nature* **441** (7095), 847-852

D'autres données, acquises par microscopie à force atomique, indiquent, en revanche, que les molécules de gp120 forment des amas asymétriques d'environ 200 Å (bouquets) plutôt que des trimères symétriques de 360 kDa²¹⁹. Ces bouquets se formeraient par la liaison non covalente de plusieurs monomères de gp120 à trois molécules de gp41, un processus plus aléatoire qu'ordonné. Cette étude reste, à l'heure actuelle, « isolée » et il faudra de nouvelles investigations afin de confirmer cette hypothèse.

Un autre désaccord entre les différents laboratoires porte sur le nombre de spicules présents à la surface des virus : alors que certains s'accordent à dire que ce nombre varie entre 70 et 140 trimères^{219,220}, d'autres en observent seulement 7 à 14^{221,222,223}. En particulier, les travaux réalisés par Gelderblom *et al.*²²⁰ font état de 72 complexes protéiques sur des virus au stade de bourgeonnement, avec un relargage massif de gp120 lorsque les virions sont libérés, ceci expliquant alors le faible taux de protéine gp120 observé sur les virus matures.

En revanche, les travaux de Chertova *et al.*²²² font état d'environ dix spicules par virus, avec un taux de gp41 similaire à celui de gp120, réfutant alors l'hypothèse d'un décrochage de gp120. Ces analyses ont également montré que le complexe gp41/gp120 était stable jusqu'à une température de 50°C, suggérant à nouveau que le relargage de gp120 était peu probable à des températures physiologiques.

II-1.2.2. La boucle V3

La boucle V3 est une séquence d'environ 35 résidus (31 à 39), hautement glycosylée et hypervariable, qui joue un rôle crucial dans les multiples fonctions de gp120 et même du complexe Env entier. Il ne s'agit en réalité pas vraiment d'une boucle, car elle est trop longue (une boucle possède, par définition, 6 à 16 résidus²²⁴) et présente une structure secondaire en feuillet β. Elle détermine le choix du corécepteur.

Des travaux de modélisation moléculaire ont tout d'abord suggéré que la charge globale de la boucle V3 jouait un rôle primordial dans les interactions avec les récepteurs cellulaires, bien plus que la séquence en elle-même²²⁵. Notamment, la charge de la boucle V3 d'un isolat R5 est de +3 à +5 alors que celle d'une souche X4 s'étend entre +7 et +10.

²¹⁹ Kuznetsov, Y. G., Victoria, J. G., Robinson, W. E., Jr. and McPherson, A. (2003) *J Virol* **77** (22), 11896-11909

²²⁰ Gelderblom, H. R. (1991) *Aids* **5** (6), 617-637

²²¹ Layne, S. P., Merges, M. J., Dembo, M., Spouge, J. L., Conley, S. R., Moore, J. P., Raina, J. L., Renz, H., Gelderblom, H. R. and Nara, P. L. (1992) *Virology* **189** (2), 695-714

²²² Chertova, E., Bess Jr, J. W., Jr., Crise, B. J., Sowder, I. R., Schaden, T. M., Hilburn, J. M., Hoxie, J. A., Benveniste, R. E., Lifson, J. D., Henderson, L. E. and Arthur, L. O. (2002) *J Virol* **76** (11), 5315-5325

²²³ Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A. and Roux, K. H. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (26), 15812-15817

²²⁴ Leszczynski, J. F. and Rose, G. D. (1986) *Science* **234** (4778), 849-855

²²⁵ Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (2000) *J Virol* **74** (4), 1961-1972

Puis, des études RMN sur des peptides de la boucle V3 en complexe avec des anticorps ont permis de proposer que la structure de la boucle V3 est de type feuillet β , avec une séquence ³¹⁹GPGR³²² bien conservée d'une souche à l'autre, formant un coude à l'apex de V3²²⁶. Ces travaux ont également suggéré que la partie N-terminale ainsi que quatre résidus de la partie C-terminale étaient engagés dans la fixation aux corécepteurs et que la structure de type β -hairpin induite par le motif GPGR était probablement engagée dans le choix du corécepteur puisque la séquence et la conformation du motif β -hairpin de la boucle V3 d'une souche R5 (MN) rejoignent celles décrites pour des chimiokines du récepteur CCR5 alors que celles de la boucle V3 d'un isolat X4 (IIIB) ressemblent au motif β -hairpin de SDF-1 α , ligand du récepteur CXCR4.

Des travaux de cristallisation ont validé les résultats de RMN, avec un motif GPGR extrêmement conservé formant un coude à la pointe de V3²²⁷.

En 2005, la structure cristallographique de gp120 avec sa boucle V3 réalisée en présence d'un fragment de CD4 et d'un fragment de l'anticorps X5, dirigé contre l'épitope CD4i, a permis de décrire plus précisément la structure de la boucle V3²²⁸. Cette boucle peut être divisée en trois régions : une base conservée, une tige flexible et une pointe de type β -hairpin. Les données observées sur V3 (grande surface, flexibilité conformationnelle²²⁹) laissent penser que V3 sert de crochet moléculaire. Avant la fixation à CD4, V3 permettrait de maintenir les monomères de gp120 sous forme trimérique ; la fixation de CD4, entraînant la formation du site de fixation aux corécepteurs, induirait le mouvement de V3 vers la membrane cellulaire. Dans ce contexte, V3 servirait de « poignée » pour initier la fusion des membranes, dirigée par gp41.

Plusieurs travaux ont également permis de déterminer que V3 était impliquée dans la fixation des corécepteurs et, en particulier, qu'elle était responsable du tropisme viral. Des analyses de séquences ont notamment permis de définir que si les positions 11 et/ou 25 de V3 (résidus 306 et 322 de la souche HXBc2) sont chargées positivement, les virus utilisent CXCR4, sinon ils interagissent avec CCR5^{230,231,232}. Ces acides aminés sont situés dans la tige variable de V3 et la distance qui les sépare (17Å) suggère qu'ils interagissent avec différents

²²⁶ Sharon, M., Kessler, N., Levy, R., Zolla-Pazner, S., Gorlach, M. and Anglist, J. (2003) *Structure* **11** (2), 225-236

²²⁷ Stanfield, R. L., Gorny, M. K., Williams, C., Zolla-Pazner, S. and Wilson, I. A. (2004) *Structure (Camb)* **12** (2), 193-204

²²⁸ Huang, C. C., Tang, M., Zhang, M. Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R. and Kwong, P. D. (2005) *Science* **310** (5750), 1025-1028

²²⁹ Watabe, T., Kishino, H., Okuhara, Y. and Kitazoe, Y. (2006) *Genetics* **172** (3), 1385-1396

²³⁰ De Jong, J. J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M. and Goudsmit, J. (1992) *J Virol* **66** (11), 6777-6780

²³¹ Fouchier, R. A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F. and Schuitemaker, H. (1992) *J Virol* **66** (5), 3183-3187

²³² Resch, W., Hoffman, N. and Swanstrom, R. (2001) *Virology* **288** (1), 51-62

sites du corécepteur²³³. Récemment, des travaux²³⁴ sont venus compléter la « loi du 11/25 ». Un troisième résidu, en position 24, a été défini comme crucial pour le choix du corécepteur. Ainsi, si au moins un des acides aminés en position 11, 24 ou 25 est chargé positivement, la souche sera de tropisme X4, sinon, il s'agira d'une souche R5. Cette loi s'applique pour 89% des isolats X4 testés (contre 72% pour la loi « 11/25 ») et pour 96% des virus R5. Une étude récente²³⁵ réalisée sur des souches dual-tropic suggère, par ailleurs, que les résidus de la base de la boucle V3 contribuent au tropisme R5 alors qu'un groupe de résidus basiques situés dans la partie N-terminale de la tige participe au tropisme X4.

Les glycosylations de V3 peuvent également entrer en jeu dans le choix du corécepteur. En effet, un site de glycosylation situé dans la boucle V3 (Asn301 pour la souche HXBc2) est glycosylé dans 100% des isolats de type R5 mais dans seulement 36% des virus de type X4²³⁶. Ceci a également été montré par mutagénèse dirigée^{237,238}. La conséquence d'une telle délétion peut être l'exposition d'un acide aminé chargé positivement, masqué au préalable par la chaîne glycosylée, la réduction de la charge négative due aux glycanes, et donc l'augmentation de la charge globale de V3, ou bien la modification de la structure de V3.

II-1.2.3. Le rôle des glycosylations

La protéine gp120 est l'une des protéines les plus glycosylées dans la nature²³⁹, beaucoup plus que les protéines d'enveloppe d'autres rétrovirus. Elle a même été décrite comme possédant un véritable « bouclier de glycosylations »²⁴⁰. L'analyse de la structure antigénique de gp120 montre en effet que la majorité de la surface protéique est inaccessible au système immunitaire du fait des N-glycosylations et de l'occlusion oligomérique²⁴¹. En revanche, gp120 ne possède pas de O-glycosylation.

²³³ Huang, C. C., Tang, M., Zhang, M. Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R. and Kwong, P. D. (2005) *Science* **310** (5750), 1025-1028

²³⁴ Cardozo, T., Kimura, T., Philpott, S., Weiser, B., Burger, H. and Zolla-Pazner, S. (2007) *AIDS Res Hum Retroviruses* **23** (3), 415-426

²³⁵ Nolan, K. M., Jordan, A. P. and Hoxie, J. A. (2007) *J Virol*, in press

²³⁶ Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C. and Korber, B. (2004) *Glycobiology* **14** (12), 1229-1246

²³⁷ Ogert, R. A., Lee, M. K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M. A. and Cho, M. W. (2001) *J Virol* **75** (13), 5998-6006

²³⁸ Pollakis, G., Kang, S., Kliphuis, A., Chalaby, M. I., Goudsmit, J. and Paxton, W. A. (2001) *J Biol Chem* **276** (16), 13433-13441

²³⁹ Myers, G. and Lenroot, R. (1992) *AIDS Res Hum Retroviruses* **8** (8), 1459-1460

²⁴⁰ Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D. and Shaw, G. M. (2003) *Nature* **422** (6929), 307-312

²⁴¹ Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. G. (1998) *Nature* **393** (6686), 705-711

Ces N-glycosylations interviennent tant au niveau des régions conservées que des régions hypervariables²⁴². Elles sont créées au niveau de séquences particulières : Asn-X-[Ser ou Thr], où X est un acide aminé quelconque.

Le nombre de N-glycosylations potentielles sur gp120 varie de 18 à 33 avec une moyenne de 25²⁴³. Cette différence est en partie due à la variation de séquence de gp120, qui induit l'insertion ou la délétion de sites de glycosylation au niveau des boucles hypervariables. Tous les sites de glycosylation potentiels ne sont pas occupés sur gp120²⁴⁴ : le contexte protéique ne favorise pas toujours la glycosylation. Par exemple, la séquence Asn-Asn-Thr-Thr est une séquence très répandue chez le VIH, et, quelquefois, l'occlusion stérique peut empêcher l'addition de chaînes glycosylées au niveau des deux asparagines (Asn).

Il existe deux types de N-glycosylations pour gp120 : celles ancrées dans des régions constantes, et celles impliquées dans les boucles hypervariables mais également dans la région conservée C4, qui sont relativement instables et varient en fonction des mutations de séquences²⁴⁵. Différents types de glycanes sont associés à ces glycosylations constantes ou variables (figure 10) : les sites instables sont généralement constitués d'oligosaccharides complexes (63%) alors que les sites fixes sont composés de structures riches en mannose (33%) ou d'oligosaccharides hybrides (mélange de mannose et de carbohydrates complexes – 4%)^{242,246}. Un modèle structural de gp120 glycosylée a suggéré que les glycanes riches en mannose sont regroupés sur une surface de la protéine et que les carbohydrates complexes sont localisés dans une région distincte de la surface protéique²⁴⁴.

²⁴² Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. and Gregory, T. J. (1990) *J Biol Chem* **265** (18), 10373-10382

²⁴³ Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C. and Detours, V. (2001) *Br Med Bull* **58**, 19-42

²⁴⁴ Zhu, X., Borchers, C., Bienstock, R. J. and Tomer, K. B. (2000) *Biochemistry* **39** (37), 11194-11204

²⁴⁵ Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C. and Korber, B. (2004) *Glycobiology* **14** (12), 1229-1246

²⁴⁶ Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Martin-Amedee, A. M. and Montelaro, R. C. (1995) *AIDS Res Hum Retroviruses* **11** (2), 191-202

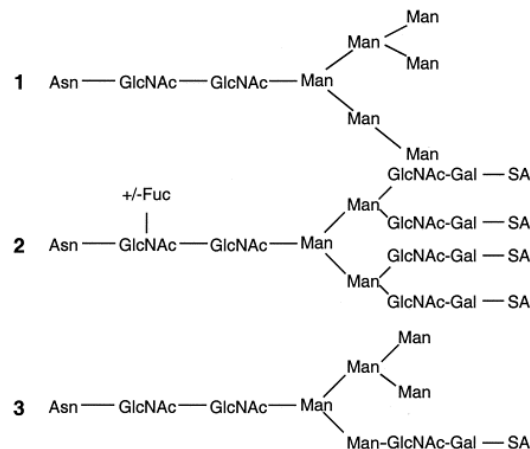


Figure 10 : structure des N-glycanes généralement observés dans une glycoprotéine²⁴⁷

1) glycanes riches en mannose. Ces structures présentent un maximum de 9 mannoses branchés, non modifiés. 2) glycanes complexes. Ils sont principalement composés de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et de galactose (Gal) lié à des acides sialiques (SA). Le nombre d'unités GlcNAc-Gal et de SA peut varier et un fucose peut être ajoutés au premier GlcNAc situé dans le core. 3) glycanes hybrides. Ils représentent un mélange des deux structures précédentes et sont donc à la fois constitués de mannose, de GlcNAc-Gal et de SA.

Une étude a montré que l'absence d'un site de glycosylation à la base de la boucle V3 entraînait un taux de substitution d'acides aminés plus élevé ; ceci conduisant à une protection vis-à-vis des anticorps du système immunitaire²⁴⁸. L'hypothèse est que l'absence de la glycosylation rend le virus plus sensible au système immunitaire et que, de ce fait, la boucle V3 est soumise à une pression sélective plus forte. Pour échapper au système immunitaire, le virus mute donc plus rapidement au niveau de ce site de glycosylation.

Ces glycosylations, associées à la grande variabilité de certaines séquences, modulent donc l'immunogénicité et l'antigénicité de gp120 et permettent au virus d'échapper au système immunitaire, lors de l'infection.

II-1.3. La protéine gp41

II-1.3.1. Structure

La structure de gp41 a été découverte en 1997^{249,250}. Cette protéine (344 acides aminés) est constituée d'un domaine cytoplasmique (environ 150 résidus), d'une partie transmembranaire (21 acides aminés) et d'un ectodomaine ou région extracellulaire (172 résidus). L'ectodomaine porte, de sa partie N- vers sa partie C-terminale, un peptide fusogène

²⁴⁷ Cutalo, J. M., Deterding, L. J. and Tomer, K. B. (2004) *J Am Soc Mass Spectrom* **15** (11), 1545-1555

²⁴⁸ Kalish, M. L., Korber, B. T., Pillai, S., Robbins, K. E., Leo, Y. S., Saekhou, A., Verghese, I., Gerrish, P., Goh, C. L., Lupo, D., Tan, B. H., Brown, T. M. and Chan, R. (2002) *Virology* **304** (2), 311-329

²⁴⁹ Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. and Kim, P. S. (1997) *Cell* **89** (2), 263-273

²⁵⁰ Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1997) *Nature* **387** (6631), 426-430

hydrophobe responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire, la région N-HR (domaine de répétitions hydrophobe), une boucle de connection et la région C-HR (domaine de répétitions hydrophobe situé dans la partie C-terminale). Peu de données décrivent la structure de gp41 et du trimère de gp41 dans leur état préfusionnel puisque, dans la conformation native du virus, l'ectodomaine de gp41 est en grande partie masqué par gp120 (figure 11A).

II-1.3.2. Mécanisme de fusion

Au cours de l'infection, sous l'influence de CD4 puis des corécepteurs, gp120 change de conformation ; gp41 est alors exposée, entraînant l'activation du processus de fusion membranaire²⁵¹. Les régions N-HR du trimère forment un corps trimérique composé d'hélices α parallèles et positionnées de façon à ce que les peptides fusogènes puissent s'insérer dans la membrane de la cellule cible (figure 11A – forme étendue). Puis, les parties C-HR des ectodomains viennent former trois hélices α externes orientées de manière anti-parallèle, autour des parties N-HR (figure 11A – forme intermédiaire). Ce motif structural particulier a été observé dans de nombreux autres virus, dont Ebola. L'insertion du peptide fusogène dans la membrane cellulaire induit la conformation en super hélice ou « *coiled coil* » (figure 11A). Ce complexe à 6 hélices, une fois formé, est stabilisé par des ponts disulfures intramoléculaires ; il correspond à la conformation active de gp41 qui permet l'activité fusogène (figure 11B). Les peptides déstabilisent, enfin, la bicouche lipidique de la membrane cellulaire en formant un pore entre les deux membranes.

²⁵¹ Sattentau, Q. J. and Moore, J. P. (1991) *J Exp Med* **174** (2), 407-415

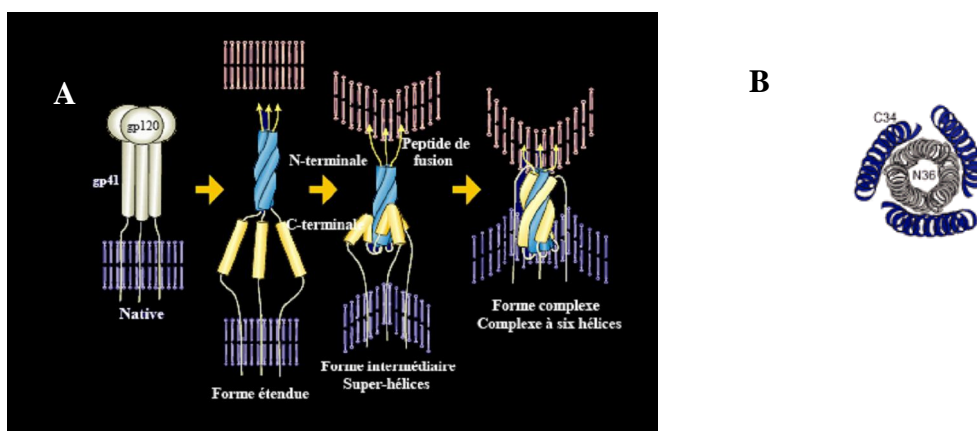


Figure 11 : conformations de gp41 au cours de l'entrée du virus dans la cellule^{252,253}

(A) Dans la conformation non liée à CD4, l'ectodomaine de gp41 est masqué par gp120. En se fixant à CD4 puis aux corécepteurs, gp120 subit des changements conformationnels qui exposent gp41 et activent le mécanisme de fusion. Les inhibiteurs de fusion tels que le T-20 agissent sur cette forme intermédiaire de gp41 en inhibant la formation du complexe à 6 hélices. Ce complexe hélicoïdal entraîne la fusion.

(B) Structure de l'ectodomaine de gp41 dans sa conformation active. Les hélices N- et C-terminales sont respectivement colorées en bleu et gris. L'ectodomaine de gp41 est un trimère symétrique, chaque monomère étant constitué de 2 hélices α antiparallèles reliées par une boucle (sur la structure ci-dessus, la boucle n'est pas représentée).

Pour certains virus enveloppés comme le virus de la grippe, la fusion des membranes virale et cellulaire est un mécanisme pH-dépendant. L'acidification du milieu entraîne, en effet, le changement de conformation de leur protéine au potentiel fusogène et son insertion dans la membrane de la cellule. Beaucoup plus complexe, le processus de fusion du VIH-1 est un mécanisme coopératif où plusieurs éléments entrent en jeu. La température influence fortement la fusion des membranes ; il a été estimé qu'elle ne pouvait pas avoir lieu sous 25°C et qu'elle était maximale à 37°C^{254,255}. En revanche, le pH n'entre pas en jeu²⁵⁶.

Certaines études montrent, par ailleurs, que gp120 peut être relarguée au cours du processus de fusion, probablement dans le but de favoriser le rapprochement des membranes virales et cellulaires^{257, 258, 259}. Ce processus n'est cependant pas bien connu et a été contredit par certains laboratoires.

²⁵² Kilgore, N., Salzwedel, K., Allaway, G. and Wild, C. (2002) *Retroconference*

²⁵³ Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. and Kim, P. S. (1997) *Cell* **89** (2), 263-273

²⁵⁴ Sinangil, F., Loyter, A. and Volsky, D. J. (1988) *FEBS Lett* **239** (1), 88-92

²⁵⁵ Frey, S., Marsh, M., Gunther, S., Pelchen-Matthews, A., Stephens, P., Ortlepp, S. and Stegmann, T. (1995) *J Virol* **69** (3), 1462-1472

²⁵⁶ Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G. and Engleman, E. G. (1987) *Cell* **49** (5), 659-668

²⁵⁷ Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A. and Sattentau, Q. J. (1990) *Science* **250** (4984), 1139-1142

²⁵⁸ Berger, E. A., Lifson, J. D. and Eiden, L. E. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (18), 8082-8086

²⁵⁹ McKeating, J. A., McKnight, A. and Moore, J. P. (1991) *J Virol* **65** (2), 852-860

II-2. Les récepteurs cellulaires du VIH

Lors de la fixation puis de l'entrée du VIH dans une cellule cible, plusieurs récepteurs cellulaires interviennent successivement (figure 12). Dans un premier temps, gp120 interagit avec le récepteur CD4. Cela induit un profond changement de conformation de gp120 (cf II-1.2.1.) et conduit à la formation d'un nouvel épitope (CD4i) qui va, à son tour, interagir avec des corécepteurs, principalement les récepteurs à chimiokines CCR5 ou CXCR4. Cette deuxième interaction va permettre une réorganisation de gp41 et conduire à la fusion des membranes virale et cellulaire.

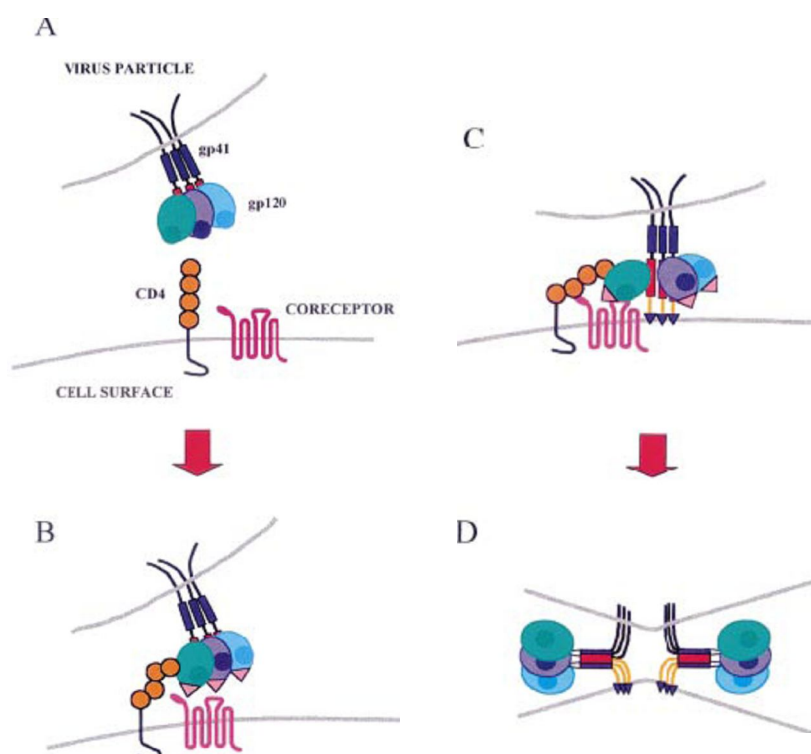


Figure 12 : mécanisme de l'entrée virale²⁶⁰

(A) interaction gp120/CD4. (B) exposition de CD4i et interaction CD4i/corécepteurs. (C) pénétration du peptide fusogène de gp41 dans la membrane cellulaire. (D) création du pore de fusion.

II-2.1. Le récepteur CD4

II-2.1.1. Description de CD4

La molécule CD4²⁶¹ est une glycoprotéine transmembranaire de 58 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines (figure 13). Elle est constituée d'une partie extracellulaire de 370 acides aminés, d'une région transmembranaire de 25 acides aminés et d'une partie cytoplasmique de 38 acides aminés, généralement associée avec la protéine à

²⁶⁰ Clapham, P. R. and McKnight, A. (2002) *J Gen Virol* **83** (Pt 8), 1809-1829

²⁶¹ Maddon, P. J., Littman, D. R., Godfrey, M., Maddon, D. E., Chess, L. and Axel, R. (1985) *Cell* **42** (1), 93-104

tyrosine kinase p56^{Lck}. La protéine p56^{Lck} semble jouer plusieurs rôles : activation des lymphocytes T²⁶², adressage des récepteurs CD4 de façon localisée à la surface cellulaire²⁶³, inhibition de l'internalisation de CD4²⁶⁶... Il semble que p56^{Lck}, associée à CD4, permette de moduler l'infection par le VIH²⁶⁴.

La région extracellulaire de CD4 est assemblée en quatre domaines D1, D2, D3 et D4^{265,266,267}. Tous les domaines excepté D3 possèdent un pont disulfure, D3 et D4 présentent 2 N-glycosylations. De plus, il existe deux régions flexibles entre les domaines D2 et D3 ainsi qu'entre D4 et la membrane.

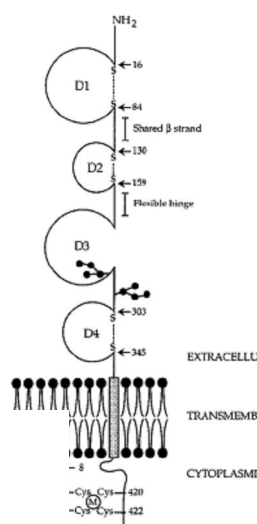


Figure 13 : structure du récepteur CD4²⁶⁸

Les 4 domaines de CD4 sont représentés par des boucles, les deux sites de glycosylation sont en gras et les ponts disulfures ainsi que leur localisation dans la séquence d'acides aminés sont schématisés en pointillés.

La molécule CD4 caractérise les lymphocytes T auxiliaires. Elle est également présente sur les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques des ganglions de la rate et de l'épiderme (les cellules de Langerhans) ainsi que sur les cellules microgliales du cerveau. CD4 est un ligand pour les molécules du CMH de classe II. A la surface des lymphocytes T auxiliaires, son rôle est d'augmenter l'avidité entre les lymphocytes et les

²⁶² Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D. R. and Turner, J. M. (1991) *Cell* **64** (3), 511-520

²⁶³ Foti, M., Phelouzat, M. A., Holm, A., Rasmusson, B. J. and Carpentier, J. L. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (4), 2008-2013

²⁶⁴ Yousefi, S., Ma, X. Z., Singla, R., Zhou, Y. C., Sakac, D., Bali, M., Liu, Y., Sahai, B. M. and Branch, D. R. (2003) *Clin Exp Immunol* **133** (1), 78-90

²⁶⁵ Maddon, P. J., Littman, D. R., Godfrey, M., Maddon, D. E., Chess, L. and Axel, R. (1985) *Cell* **42** (1), 93-104

²⁶⁶ Clark, S. J., Jefferies, W. A., Barclay, A. N., Gagnon, J. and Williams, A. F. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (6), 1649-1653

²⁶⁷ Maddon, P. J., Molineaux, S. M., Maddon, D. E., Zimmerman, K. A., Godfrey, M., Alt, F. W., Chess, L. and Axel, R. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (24), 9155-9159

²⁶⁸ Bour, S., Geleziunas, R. and Wainberg, M. A. (1995) *Microbiol Rev* **59** (1), 63-93

cellules présentatrices d'antigènes. CD4 agit également comme récepteur pour l'IL-16, une cytokine chimiotactique pour les lymphocytes T²⁶⁹.

La diminution progressive du taux de lymphocytes T circulants, conduisant à une immunodéficience marquée des malades, a rapidement orienté les recherches vers cette lignée cellulaire. Elles ont permis de découvrir que le VIH utilise le récepteur CD4, présent à la surface des lymphocytes T, pour y pénétrer et que cette activité infectieuse peut être bloquée par l'usage d'anticorps dirigés contre ce récepteur^{270,271}. La transfection de cellules immortalisées humaines (lymphocytes T primaires, cellules B lymphoblastoïdes et cellules épithéliales) avec CD4 a confirmé le rôle de ce récepteur dans le processus d'adsorption du virus sur la cellule cible²⁷².

II-2.1.2. Interaction entre gp120 et CD4

Le site de fixation de CD4 à gp120 a été étudié par cristallographie aux rayons X de CD4 complexé à différents anticorps, ainsi que par mutagenèse dirigée, et a été localisé sur le domaine D1. En particulier, l'interaction gp120/CD4 implique des contacts directs entre 22 résidus de CD4, concentrés dans le segment 25-64, et 26 résidus de gp120, répartis sur six segments. Les résidus Phe43 et Arg59 de CD4 créent de multiples contacts avec les résidus extrêmement conservés Asp368, Glu370 et Trp427 de gp120 (figure 14). Le résidu Phe43 s'insère dans une cavité hydrophobe de gp120, tandis que l'Arg59 interagit avec gp120 à l'extérieur de cette cavité²⁷³.

²⁶⁹ Cruikshank, W. W., Kornfeld, H. and Center, D. M. (1998) *Int Rev Immunol* **16** (5-6), 523-540

²⁷⁰ Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. and Weiss, R. A. (1984) *Nature* **312** (5996), 763-767

²⁷¹ Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., Danquet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Veziret, F., Rouzioux, C., Gluckman, J. C., Chermann, J. C. and et al. (1984b) *Science* **225** (4657), 59-63

²⁷² Maddon, P. J., Dalglish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A. and Axel, R. (1986) *Cell* **47** (3), 333-348

²⁷³ Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996) *Nature* **384** (6605), 179-183

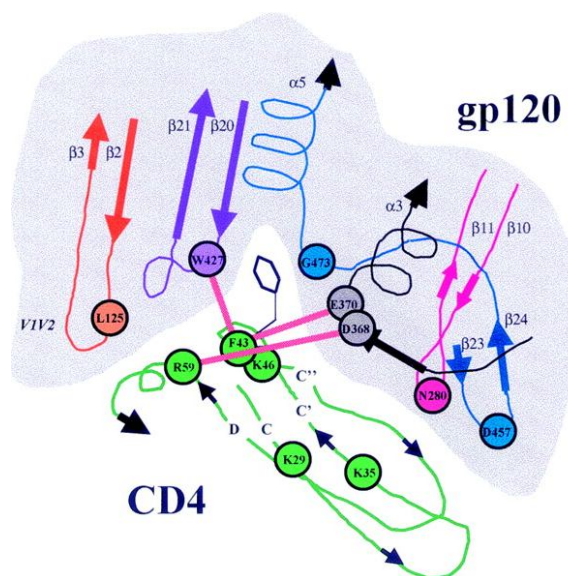


Figure 14 : schéma de l'interaction gp120/CD4²⁷⁴

Les acides aminés de 6 régions de gp120 s'organisent pour créer le site de fixation à CD4. La chaîne latérale de Phe43 pénètre dans cette cavité pour créer le contact.

La structure cristallographique du complexe gp120/CD4 ne révèle pas de réarrangement dans les domaines D1 et D2, sous l'influence de gp120²⁷⁵. Cependant, il est possible que la flexibilité observée entre D2 et D3 ainsi qu'entre D4 et la membrane soit nécessaire à CD4 pour « approcher » gp120 de façon latérale et pour orienter le site de fixation aux corécepteurs vers la membrane cellulaire.

Récemment, l'implication d'une autre protéine de surface dans le mécanisme d'entrée virale a été démontrée : l'oxidoreductase protein disulfide isomerase ou PDI^{276,277,278}. PDI semble, en effet, pouvoir se fixer sur le domaine D3 de CD4. Ainsi, lors de l'adsorption du VIH à la surface cellulaire, la formation du complexe PDI/CD4/gp120 permet à PDI de réduire 2 des 9 ponts disulfures de gp120, induisant alors des changements conformationnels majeurs^{278,279,280}.

²⁷⁴ Clapham, P. R. and McKnight, A. (2002) *J Gen Virol* **83** (Pt 8), 1809-1829

²⁷⁵ Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

²⁷⁶ Ryser, H. J., Levy, E. M., Mandel, R. and DiSciullo, G. J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (10), 4559-4563

²⁷⁷ Fenouillet, E., Barbouche, R., Courageot, J. and Miquelès, R. (2001) *J Infect Dis* **183** (5), 744-752

²⁷⁸ Gallina, A., Hanley, T. M., Mandel, R., Trahey, M., Broder, C. C., Viglianti, G. A. and Ryser, H. J. (2002) *J Biol Chem* **277** (52), 50579-50588

²⁷⁹ Barbouche, R., Miquelès, R., Jones, I. M. and Fenouillet, E. (2003) *J Biol Chem* **278** (5), 3131-3136

²⁸⁰ Markovic, I., Stantchev, T. S., Fields, K. H., Tiffany, L. J., Tomic, M., Weiss, C. D., Broder, C. C., Strebel, K. and Clouse, K. A. (2004) *Blood* **103** (5), 1586-1594

II-2.1.3. Interaction entre CD4 et d'autres protéines virales

Plusieurs travaux ont montré que les protéines Vpu, Env et Nef du VIH participent au catabolisme du récepteur CD4 à la surface de cellules infectées^{281,282}. Au début de l'infection, Nef sous-régule les molécules CD4 présentes à la surface cellulaire, en accélérant leur endocytose et leur dégradation par les lysosomes. A un stade plus avancé de l'infection, le précurseur gp160, produit dans la cellule, se fixe aux récepteurs CD4 synthétisés et les retient dans le réticulum endoplasmique. La formation de ces complexes gp160/CD4 inhibe l'expression de CD4 à la surface cellulaire mais également la maturation de gp160. La protéine Vpu régule la demi-vie des molécules CD4 complexées à gp160, en induisant leur dégradation. Ce processus entraîne la libération des molécules gp160, leur maturation et leur incorporation dans les virions synthétisés²⁸³.

Cette régulation négative de l'expression de CD4 permettrait d'une part de diminuer la réponse immunitaire, puisqu'à la surface cellulaire CD4 interagit avec les cellules présentatrices d'antigènes²⁸³, et d'autre part d'augmenter l'infectivité lors du bourgeonnement des virions. En effet, il a été suggéré que les récepteurs CD4 de la cellule infectée pouvaient interagir avec les protéines gp120 des virions néosynthétisés et ainsi, piéger les virions à la surface cellulaire, diminuant alors l'infectivité²⁸⁴.

II-2.2. Les récepteurs à chimiokines

II-2.2.1. Découverte des corécepteurs CXCR4 et CCR5

L'observation de lignées cellulaires animales transfectées avec CD4 a démontré que la liaison du virus avec ce récepteur ne conduisait pas forcément à une fusion entre les deux membranes et que, par conséquent, le virus avait besoin de la présence d'un deuxième élément à la surface de la cellule pour y pénétrer^{285,286,287}. D'autres preuves de l'existence d'un deuxième récepteur cellulaire ont découlé du fait que les souches de VIH présentaient différents tropismes^{288,289,290} et ont conduit à penser que ces souches utilisaient différents corécepteurs²⁹¹.

²⁸¹ Cullen, B. R. (1998) *Cell* **93** (5), 685-692

²⁸² Doms, R. W. and Trono, D. (2000) *Genes Dev* **14** (21), 2677-2688

²⁸³ Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A. and Strebel, K. (1992) *J Virol* **66** (1), 226-234

²⁸⁴ Ross, T. M., Oran, A. E. and Cullen, B. R. (1999) *Curr Biol* **9** (12), 613-621

²⁸⁵ Maddon, P. J., Dalglish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A. and Axel, R. (1986) *Cell* **47** (3), 333-348

²⁸⁶ Ashorn, P. A., Berger, E. A. and Moss, B. (1990) *J Virol* **64** (5), 2149-2156

²⁸⁷ Dragic, T., Charneau, P., Clavel, F. and Alizon, M. (1992) *J Virol* **66** (8), 4794-4802

²⁸⁸ Cheng-Mayer, C., Seto, D., Tatenos, M. and Levy, J. A. (1988) *Science* **240** (4848), 80-82

²⁸⁹ Fenyo, E. M., Morfeldt-Manson, L., Chiodi, F., Lind, B., von Gegerfelt, A., Albert, J., Olausson, E. and Asjo, B. (1988) *J Virol* **62** (11), 4414-4419

²⁹⁰ Fauci, A. S. (1996) *Nature* **384** (6609), 529-534

²⁹¹ Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E. A. (1996) *Science* **272** (5270), 1955-1958

Par la suite, l'existence d'un corécepteur a été démontrée de manière tangible²⁹². Le récepteur CXCR4 appartenant à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G et possédant sept segments transmembranaires a été identifié. Il appartient à la famille des récepteurs à chimiokines et son ligand naturel est SDF-1 α ^{293,294,295}.

Dans le même temps, les chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β ont démontré leur aptitude à inhiber la pénétration du VIH dans les cellules lymphocytaires²⁹⁶. Peu après, le récepteur membranaire commun à ces trois chimiokines, CCR5, a été identifié^{297,298}. Le rôle primordial de CCR5 comme corécepteur des souches virales à tropisme macrophagique a simultanément été mis en évidence par plusieurs laboratoires^{299,300,301}.

II-2.2.2. Cas particulier de CCR5 : la mutation CCR5 Δ 32

L'importance du corécepteur CCR5 dans la transmission virale a été démontrée par la découverte de sujets possédant une mutation génétique, CCR5 Δ 32. Elle se traduit par la délétion de 32 acides aminés sur le gène codant pour le récepteur CCR5, induisant la synthèse d'un polypeptide tronqué, inactif et non exprimé à la surface des cellules (Benkirane *et al.*, 1997). Cette mutation est non létale, y compris pour les individus homozygotes, CCR5 Δ 32³⁰². Elle affecte la population caucasienne entre 15 et 20% sous une forme génotypique hétérozygote et environ 1% sous sa forme homozygote^{303,304}.

Les premières observations épidémiologiques faisaient état d'une fréquence d'infection virale diminuée de 35% et d'une progression vers la phase de SIDA retardée chez les personnes hétérozygotes et ne dénombraient aucun cas de sujet homozygote porteur de

²⁹² Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. and Berger, E. A. (1996) *Science* **272** (5263), 872-877

²⁹³ Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. and Springer, T. A. (1996) *Nature* **382** (6594), 829-833

²⁹⁴ Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C. C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T. A. and Kishimoto, T. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (25), 14726-14729

²⁹⁵ Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., Loetscher, M., Baggiolini, M. and Moser, B. (1996) *Nature* **382** (6594), 833-835

²⁹⁶ Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. and Lusso, P. (1995) *Science* **270** (5243), 1811-1815

²⁹⁷ Combadiere, C., Ahuja, S. K., Tiffany, H. L. and Murphy, P. M. (1996) *J Leukoc Biol* **60** (1), 147-152

²⁹⁸ Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. and Parmentier, M. (1996a) *Biochemistry* **35** (11), 3362-3367

²⁹⁹ Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E. A. (1996) *Science* **272** (5270), 1955-1958

³⁰⁰ Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. and Landau, N. R. (1996) *Nature* **381** (6584), 661-666

³⁰¹ Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. and Paxton, W. A. (1996) *Nature* **381** (6584), 667-673

³⁰² Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A. and Landau, N. R. (1996) *Cell* **86** (3), 367-377

³⁰³ Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R. and O'Brien, S. J. (1996) *Science* **273** (5283), 1856-1862

³⁰⁴ Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cogniaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G. and Parmentier, M. (1996b) *Nature* **382** (6593), 722-725

souches virales R5^{305,306}. Cependant, des observations ultérieures ont révélé de rares cas de contamination d'individus homozygotes pour la mutation par des souches X4 ou R5X4^{307,308}.

Récemment, des études ont montré que la protéine CCR5Δ32 fonctionnait comme un régulateur négatif de l'expression de CCR5 et CXCR4³⁰⁹. Ainsi, la résistance génétique au VIH serait due d'une part à la perte d'expression des récepteurs CCR5 sauvages et, d'autre part, à la sous-régulation de l'expression de CXCR4.

II-2.2.3. Structure des récepteurs à chimiokines

La fonction biologique principale des chimiokines et de leurs récepteurs consiste à réguler la circulation des cellules du système immunitaire. La liaison d'une chimiokine sur son récepteur déclenche une cascade de signalisation et entraîne la migration des cellules au site inflammatoire où les chimiokines sont sécrétées.

Les récepteurs à chimiokines appartiennent à une famille de protéines à sept domaines transmembranaires. La partie N-terminale et 3 boucles extracellulaires sont exposées à la surface cellulaire et interagissent avec les chimiokines (figure 15). Ces interactions sont redondantes (plus de 50 chimiokines pour plus de 20 récepteurs). CCR5 et CXCR4 sont des protéines de 352 acides aminés qui possèdent une partie N-terminale très acide. CXCR4 contient deux sites de glycosylation (un sur la partie N-terminale et l'autre sur la seconde boucle extracellulaire E2) alors que CCR5 en possède un seul, situé sur la boucle E3. La seule chimiokine se liant au CXCR4 est le SDF-1α, alors que le CCR5 peut en lier quatre : RANTES, MIP-1α, MIP-1β et MCP2.

³⁰⁵ Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cogniaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G. and Parmentier, M. (1996b) *Nature* **382** (6593), 722-725

³⁰⁶ Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N. R., Phair, J., Ho, D. D. and Koup, R. A. (1996) *Nat Med* **2** (11), 1240-1243

³⁰⁷ Michael, N. L., Nelson, J. A., KewalRamani, V. N., Chang, G., O'Brien, S. J., Mascola, J. R., Volsky, B., Louder, M., White, G. C., 2nd, Littman, D. R., Swanstrom, R. and O'Brien, T. R. (1998) *J Virol* **72** (7), 6040-6047

³⁰⁸ Naif, H. M., Cunningham, A. L., Alali, M., Li, S., Nasr, N., Buhler, M. M., Schols, D., de Clercq, E. and Stewart, G. (2002) *J Virol* **76** (7), 3114-3124

³⁰⁹ Agrawal, L., Lu, X., Qingwen, J., VanHorn-Ali, Z., Nicolescu, I. V., McDermott, D. H., Murphy, P. M. and Alkhatib, G. (2004) *J Virol* **78** (5), 2277-2287

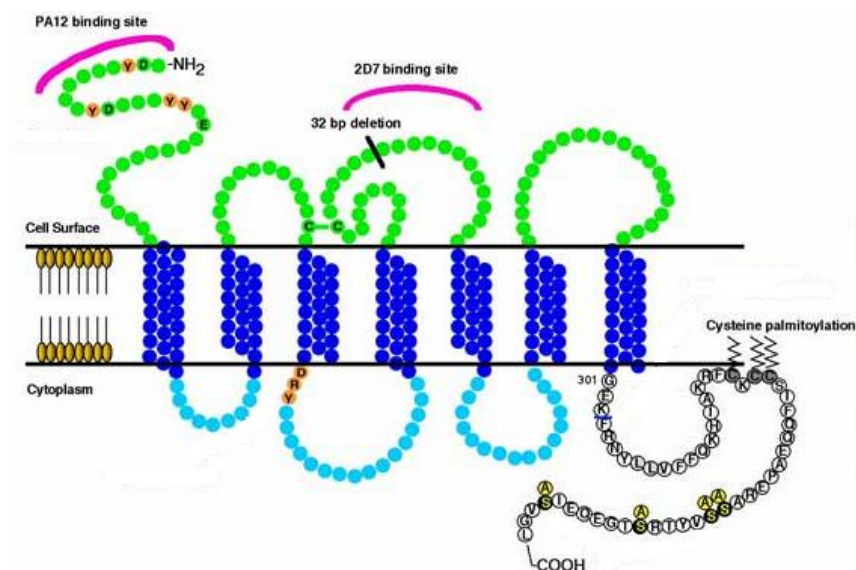


Figure 15 : structure de CCR5³¹⁰

Le récepteur CCR5 est constitué de 7 domaines transmembranaires. Trois boucles extracellulaires ainsi que le segment N-terminal sont exposés à la surface cellulaire tandis que trois boucles intracellulaires et la partie C-terminale sont situées à l'intérieur de la cellule. Deux domaines de fixation à des anticorps sont représentés en rose. La délétion éventuelle de 32 pb est également notée.

Ces récepteurs peuvent présenter différentes conformations à la surface d'une même cellule ou en fonction du type cellulaire³¹¹, qui peuvent conduire à la formation d'homodimères comme décrit pour CCR5³¹² ou CXCR4³¹³, voire même d'oligomères^{314,315,316,317}. Ces récepteurs peuvent également hétérodimériser avec le chimiorécepteur CCR2, mais aucun hétérodimère CCR5/CXCR4 n'a, à l'heure actuelle, été observé^{318,319,317}. Les conséquences de cette dimérisation avec CCR2 sur l'infection par le VIH ont été étudiées mais ont donné des résultats contradictoires^{320,321,322,317}. Certaines études ont montré que, lors de l'infection par le VIH, le processus de fusion requiert plusieurs molécules de corécepteurs. En effet, il semble que 4 à 6 CCR5³²³ ainsi que plusieurs

³¹⁰ Bardi, J. S. (2004) *News & Views* **3** (31)

³¹¹ Baribaud, F., Edwards, T. G., Sharron, M., Brelot, A., Heveker, N., Price, K., Mortari, F., Alizon, M., Tsang, M. and Doms, R. W. (2001) *J Virol* **75** (19), 8957-8967

³¹² Lapham, C. K., Zaitseva, M. B., Lee, S., Romanstseva, T. and Golding, H. (1999) *Nat Med* **5** (3), 303-308

³¹³ Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Fernandez, S., Martin de Ana, A., Jones, D. R., Toran, J. L. and Martinez, A. C. (2001) *Embo J* **20** (10), 2497-2507

³¹⁴ Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M. and Marullo, S. (2002) *J Biol Chem* **277** (38), 34666-34673

³¹⁵ Babcock, G. J., Farzan, M. and Sodroski, J. (2003) *J Biol Chem* **278** (5), 3378-3385

³¹⁶ Lemay, J., Marullo, S., Jockers, R., Alizon, M. and Brelot, A. (2005) *Nat Immunol* **6** (6), 535-536

³¹⁷ Percherancier, Y., Berchiche, Y. A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M. and Heveker, N. (2005) *J Biol Chem* **280** (11), 9895-9903

³¹⁸ Babcock, G. J., Farzan, M. and Sodroski, J. (2003) *J Biol Chem* **278** (5), 3378-3385

³¹⁹ El-Asmar, L., Springael, J. Y., Ballet, S., Andrieu, E. U., Vassart, G. and Parmentier, M. (2005) *Mol Pharmacol* **67** (2), 460-469

³²⁰ Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., de Ana, A. M. and Martinez, A. C. (1999) *Nature* **400** (6746), 723-724

³²¹ Vila-Coro, A. J., Mellado, M., Martin de Ana, A., Lucas, P., del Real, G., Martinez, A. C. and Rodriguez-Frade, J. M. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (7), 3388-3393

³²² Rodriguez-Frade, J. M., del Real, G., Serrano, A., Hernanz-Falcon, P., Soriano, S. F., Vila-Coro, A. J., de Ana, A. M., Lucas, P., Prieto, I., Martinez, A. C. and Mellado, M. (2004) *Embo J* **23** (1), 66-76

³²³ Kuhmann, S. E., Platt, E. J., Kozak, S. L. and Kabat, D. (2000) *J Virol* **74** (15), 7005-7015

molécules de CD4³²⁴ et 3 à 6 trimères d'Env soient nécessaires à la formation du pore de fusion. Le recrutement de ce nombre élevé de récepteurs serait rendu possible grâce à l'existence de radeaux lipidiques, des domaines membranaires riches en glycolipides, qui permettent de regrouper des molécules en « *cluster* », à la surface de la cellule (II-3.).

Plusieurs travaux ont rapporté l'existence d'interactions entre CCR5 et CD4^{325,326,327}, au niveau des domaines D1/D2 de CD4 et de la boucle E2 de CCR5. Etant donnée la nature dimérique de ces deux récepteurs, il est probable que ces molécules forment de larges complexes multimoléculaires³²⁵. L'inhibition de l'interaction CD4/CCR5 entraîne une diminution de la fusion membranaire lors de l'infection par le VIH, ceci suggérant que les complexes CD4/CCR5 pourraient jouer un rôle dans les étapes d'entrée virale. De plus, CD4 n'interagit pas ou peu avec CXCR4^{328,326}, ce qui pourrait expliquer la prédominance des souches R5 lors de l'infection par le VIH³²⁹.

Néanmoins, ces résultats sont pondérés par d'autres études concluant que CD4 et CCR5 ne forment pas de complexes stables à la surface cellulaire^{330,331}.

II-2.2.4. Interaction entre gp120 et les corécepteurs

La structure cristallographique de gp120 complexée à CCR5 ou CXCR4 n'a, à l'heure actuelle, pas été décrite et, de ce fait, les sites d'interaction précis ne sont pas connus. Néanmoins, un certain nombre d'études ont permis de localiser approximativement ces sites.

Les sites de gp120 qui interagissent avec les corécepteurs, déterminant ainsi le tropisme viral, incluent la boucle V3³³², une région conservée du feuillet intermédiaire³³³ et la boucle V1/V2³³⁴ (cf I-2.3.2.). En particulier, les données de cristallographie obtenues sur le core protéique de gp120 complexé à CD4 et 17b³³⁵, ont montré que l'anticorps 17b (mime des corécepteurs) interagit avec le feuillet intermédiaire de gp120 au niveau d'une région constituée d'un cœur hydrophobe et d'une périphérie basique (Lys121, Arg419, Ile420, Lys 421, Gln422, Ile423 et Tyr435). Cet épitope est extrêmement bien conservé parmi les

³²⁴ Layne, S. P., Merges, M. J., Dembo, M., Spouge, J. L. and Nara, P. L. (1990) *Nature* **346** (6281), 277-279

³²⁵ Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996) *Nature* **384** (6605), 179-183

³²⁶ Xiao, X., Wu, L., Stantchev, T. S., Feng, Y. R., Ugolini, S., Chen, H., Shen, Z., Riley, J. L., Broder, C. C., Sattentau, Q. J. and Dimitrov, D. S. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (13), 7496-7501

³²⁷ Gaibelet, G., Planchenault, T., Mazeres, S., Dumas, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lopez, A., Lagane, B. and Bachelier, F. (2006) *J Biol Chem* **281** (49), 37921-37929

³²⁸ Lapham, C. K., Zaitseva, M. B., Lee, S., Romanstseva, T. and Golding, H. (1999) *Nat Med* **5** (3), 303-308

³²⁹ Regoes, R. R. and Bonhoeffer, S. (2005) *Trends Microbiol* **13** (6), 269-277

³³⁰ Steffens, C. M. and Hope, T. J. (2003) *J Virol* **77** (8), 4985-4991

³³¹ Furuta, R. A., Nishikawa, M. and Fujisawa, J. (2006) *Microbes Infect* **8** (2), 520-532

³³² Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Cara, A., Gallo, R. C. and Lusso, P. (1996) *Nat Med* **2** (11), 1244-1247

³³³ Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. (1998) *Science* **280** (5371), 1949-1953

³³⁴ Cho, M. W., Lee, M. K., Carney, M. C., Berson, J. F., Doms, R. W. and Martin, M. A. (1998) *J Virol* **72** (3), 2509-2515

³³⁵ Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

différentes souches du VIH : 12 parmi les 18 résidus impliqués sont conservés dans toutes les souches du VIH-1. Il a été démontré que certains de ces résidus (Lys121, Arg419, Ile420, Lys 421 et Gln422) sont également impliqués dans la fixation à CCR5³³⁶.

La protéine gp120 interagit avec le récepteur CCR5 au niveau de sa partie N-terminale³³⁷. La boucle extracellulaire E2 semble également engagée dans le mécanisme de fusion, mais avec une plus faible affinité³³⁸. Une étude a suggéré que la partie N-terminale du corécepteur se fixe à la base de V3 pendant que la pointe de V3 vient interagir avec la boucle E2 du corécepteur³³⁹. Pour le récepteur CXCR4, la partie N-terminale et la boucle E2 semblent contribuer, dans les mêmes proportions, à l'interaction avec gp120³⁴⁰. Il est possible que certains résidus de la boucle E3 interviennent également dans la fixation à gp120, aussi bien pour CCR5³⁴¹ que pour CXCR4³⁴⁰. Enfin, les souches R5X4 interagissent préférentiellement avec la partie N-terminale des corécepteurs³³⁷.

La charge de la boucle V3 semble diriger le choix du corécepteur, certains travaux ont donc visé l'étude de la charge des sites d'interaction des corécepteurs avec gp120. La partie N-terminale de CCR5 est chargée négativement du fait de 3 acides aminés acides et de quatre tyrosines potentiellement sulfatées³⁴¹. Ces groupements sulfates sont essentiels à l'infection par une souche R5³⁴². De même, la boucle E2 possède 5 résidus négatifs. Ces groupes négatifs pourraient interagir avec des acides aminés positifs au niveau de la boucle V3 et du feuillet intermédiaire de gp120. De la même façon, Huang *et al.* ont montré que la majorité des anticorps dirigés contre l'épitope CD4i possèdent également des tyrosines sulfatées, mimant ainsi les corécepteurs³⁴³ (cf III-3.3.1.). Une étude récente³⁴⁴ a comparé la structure des tyrosines sulfatées de CCR5 et d'un anticorps anti-CD4i (412d), en complexe avec gp120 et CD4. Une des deux tyrosines sulfatées (de CCR5 et de 412d) indispensables pour l'interaction

³³⁶ Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. (1998) *Science* **280** (5371), 1949-1953

³³⁷ Doranz, B. J., Lu, Z. H., Rucker, J., Zhang, T. Y., Sharron, M., Cen, Y. H., Wang, Z. X., Guo, H. H., Du, J. G., Accavitti, M. A., Doms, R. W. and Peiper, S. C. (1997) *J Virol* **71** (9), 6305-6314

³³⁸ Ross, T. M., Bieniasz, P. D. and Cullen, B. R. (1998) *J Virol* **72** (3), 1918-1924

³³⁹ Huang, C. C., Tang, M., Zhang, M. Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R. and Kwong, P. D. (2005) *Science* **310** (5750), 1025-1028

³⁴⁰ Lin, P. F., Blair, W., Wang, T., Spicer, T., Guo, Q., Zhou, N., Gong, Y. F., Wang, H. G., Rose, R., Yamanaka, G., Robinson, B., Li, C. B., Fridell, R., Deminie, C., Demers, G., Yang, Z., Zadjura, L., Meanwell, N. and Colonno, R. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (19), 11013-11018

³⁴¹ Farzan, M., Choe, H., Vaca, L., Martin, K., Sun, Y., Desjardins, E., Ruffing, N., Wu, L., Wyatt, R., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J. (1998) *J Virol* **72** (2), 1160-1164

³⁴² Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N. P., Gerard, C., Sodroski, J. and Choe, H. (1999) *Cell* **96** (5), 667-676

³⁴³ Huang, C. C., Venturi, M., Majeed, S., Moore, M. J., Phogat, S., Zhang, M. Y., Dimitrov, D. S., Hendrickson, W. A., Robinson, J., Sodroski, J., Wyatt, R., Choe, H., Farzan, M. and Kwong, P. D. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (9), 2706-2711

³⁴⁴ Huang, C. C., Lam, S. N., Acharya, P., Tang, M., Xiang, S. H., Hussan, S. S., Stanfield, R. L., Robinson, J., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R., Bewley, C. A. and Kwong, P. D. (2007) *Science* **317** (5846), 1930-1934

avec gp120 induit des réarrangements structuraux similaires au sein de gp120. Néanmoins, les régions sulfatées du chimiorécepteur et de l'anticorps présentent globalement une structure différente.

Remarque :

Certaines souches de VIH-1, VIH-2 et VIS capables d'infecter des cellules n'exprimant pas CD4 ont été isolées. En particulier, un mutant dérivé d'une souche X4 adaptée en laboratoire (m7NDK) a été étudié³⁴⁵. La protéine gp120 de cette souche présente sept mutations dans les régions C2, C3 et V3, toutes importantes pour l'acquisition du phénotype CD4-indépendant. Néanmoins, trois mutations ont été décrites comme essentielles sur les résidus 192, 298 et 307. L'acide aminé 307 de la souche CD4-indépendante correspond à un acide aminé petit et non chargé. Ce résidu est situé à la pointe de la boucle V3, impliquée dans le tropisme viral, et fait partie du motif β -hairpin. La présence d'un acide aminé petit et peu chargé, réduisant l'encombrement stérique, pourrait favoriser l'interaction avec le corécepteur. Le résidu 298 de la souche m7NDK ne possède pas de glycosylation. Il est donc probable que cette glycosylation, réduise l'interaction de gp120 avec le corécepteur. En revanche, le résidu 192 possède une glycosylation, nécessaire à l'interaction avec le corécepteur. Cette glycosylation pourrait stabiliser la conformation ouverte du site de fixation aux corécepteurs. Ces trois mutations ont des conséquences sur la conformation de la boucle V3 et favorisent l'interaction avec CXCR4, même en absence de CD4. Un variant de la souche HXBc2 (8x) a également été isolé³⁴⁶. De tels virus sont plus facilement reconnus par des anticorps neutralisants (site de fixation aux corécepteurs plus accessible) et cela explique pourquoi, *in vivo*, on observe très peu d'infection de cellules CD4-négatives. Néanmoins, lorsque ces anticorps neutralisants sont présents en faible quantité (par exemple dans certains organes tels que le cerveau ou lors de la phase de SIDA, lorsque le système immunitaire est gravement altéré), ces souches peuvent se développer et accélérer considérablement l'évolution de la maladie en infectant des cellules qui n'expriment pas CD4³⁴⁷. Par exemple, la plupart des macaques infectés avec le VIS survivent 1 à 2 ans ; cependant, un petit pourcentage progresse plus rapidement vers la maladie en 3 à 6 mois après l'infection. De tels macaques sont infectés par des virus possédant une protéine gp120 mutée, de phénotype CD4-indépendant^{348,349}.

³⁴⁵ Dumonceaux, J., Goujon, C., Joliot, V., Briand, P. and Hazan, U. (2001) *J Virol* **75** (11), 5425-5428

³⁴⁶ LaBranche, C. C., Hoffman, T. L., Romano, J., Haggarty, B. S., Edwards, T. G., Matthews, T. J., Doms, R. W. and Hoxie, J. A. (1999) *J Virol* **73** (12), 10310-10319

³⁴⁷ Bhattacharya, J., Peters, P. J. and Clapham, P. R. (2003) *Aids* **17**, 35-43

³⁴⁸ Ryzhova, E. V., Crino, P., Shawver, L., Westmoreland, S. V., Lackner, A. A. and Gonzalez-Scarano, F. (2002) *Virology* **297** (1), 57-67

³⁴⁹ Dehghani, H., Puffer, B. A., Doms, R. W. and Hirsch, V. M. (2003) *J Virol* **77** (11), 6405-6418

II-2.2.5. Les autres corécepteurs utilisés par le VIH

Outre les corécepteurs principaux que sont CCR5 et CXCR4, des expériences *in vitro* ont montré que le VIH est capable d'utiliser d'autres récepteurs (tableau IV).

La plupart appartiennent à la famille des récepteurs à chimiokines, dont CCR3 et CCR2b^{350,351}. Des récepteurs humains à 7 domaines transmembranaires tels que STRL-33/Bonzo³⁵², étroitement lié aux récepteurs à chimiokines, BLTR (*B4 leukotriene receptor*)³⁵³ et le récepteur viral de chimiokine US28³⁵⁴ montrent également une activité de corécepteur *in vitro*. A ce jour, aucune donnée biologique n'est cependant venue confirmer l'usage de ces récepteurs *in vivo*.

Corécepteur	Ligand	VIH-1	VIH-2	VIS
CCR1	MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-3, RANTES	-	+	+
CCR2b	MCP-1, MCP-2, MCP-3	+	++	+
CCR3	Eotaxin, eotaxin-2, MCP-3, MCP-4, RANTES	++	++	+
CCR4	MDC, TARC, RANTES, MIP-1a	-	+	-
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-2	++++	++++	++++
CCR8	I-309	++	++	++
CCR9	TECK	+	-	-
CXCR2	IL-8, NAP-2, ELR+, CXCs	-	+	NT
CXCR4	SDF-1 α	+++	+++	+
CXCR7	SDF-1 α	+	+	+
CX3CR1/V28	Fractalkine	+	+	+
STRL-33/ Bonzo/TYMSTR	CXCL16	+	+++	+++
GPR1	?	+	++	+++
GPR15/Bob	?	+	++	+++
APJ	Apelin	+	+	+
Chem R23	?	+	-	+

Tableau IV : les corécepteurs utilisés par le VIH-1, le VIH-2 ou le SIV

Corécepteur rarement ou jamais utilisé (-) ; occasionnellement utilisé par quelques souches virales (+) ; utilisé par 5 à 20% des isolats viraux (++) ; fréquemment utilisé par beaucoup d'isolats ou par des sous-groupes majeurs (+++) ; majoritairement utilisé *in vivo* (++++). NT : non testé. Adapté de ³⁵⁵

II-2.3. Les récepteurs alternatifs

Certains types cellulaires ciblés par le VIH *in vivo* expriment des taux élevés de molécules CD4 (par exemple, les lymphocytes T), mais d'autres, dont les macrophages et les

³⁵⁰ Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996) *Cell* **85** (7), 1135-1148

³⁵¹ Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. and Doms, R. W. (1996) *Cell* **85** (7), 1149-1158

³⁵² Alkhatib, G., Liao, F., Berger, E. A., Farber, J. M. and Peden, K. W. (1997) *Nature* **388** (6639), 238

³⁵³ Owman, C., Garzino-Demo, A., Cocchi, F., Popovic, M., Sabirsh, A. and Gallo, R. C. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (16), 9530-9534

³⁵⁴ Rucker, J., Edinger, A. L., Sharron, M., Samson, M., Lee, B., Berson, J. F., Yi, Y., Margulies, B., Collman, R. G., Doranz, B. J., Parmentier, M. and Doms, R. W. (1997) *J Virol* **71** (12), 8999-9007

³⁵⁵ Clapham, P. R. and McKnight, A. (2002) *J Gen Virol* **83** (8), 1809-1829

cellules dendritiques, expriment des taux extrêmement faibles. Dans ce cas, le VIH doit s'attacher aux cellules par des interactions CD4-indépendantes, impliquant d'autres molécules à la surface cellulaire (tableau V).

Récepteur	Expression	Rôle dans l'attachement et l'infection
DC-SIGN	Cellules dendritiques	Fixe gp120 et internalise le VIH, participe à l'infection en <i>trans</i>
DC-SIGNR	Cellules endothéliales hépatiques	Agit de la même façon que DC-SIGN
Récepteur à mannose	Macrophages	Fixe gp120
GalCer	Cellules neuronales et gliales	Participe à l'attachement, ne permet pas l'infection
Sulfatide (dérivé sulfaté de GalCer)	Cellules épithéliales colorectales et macrophages	Confère une infection CD4-indépendante efficace d'une souche adaptée en laboratoire (NDK)
Héparane sulfate	Plusieurs types cellulaires	Attache les virus à la surface cellulaire <i>via</i> une interaction avec la boucle V3 et facilite l'accès à CD4 et aux corécepteurs, participe à l'infection en <i>trans</i>
LFA-1/ICAM-1	Cellules hématopoïétiques (LFA-1) Plusieurs types cellulaires (ICAM-1)	ICAM-1, incorporé dans les virions, augmente l'attachement et l'infection des cellules LFA-1+

Tableau V : les récepteurs cellulaires impliqués dans la fixation du VIH³⁵⁶

Ces récepteurs sont dits d'attachement dans le sens où la fixation du virus n'entraîne pas directement une infection de la cellule, mais plutôt une concentration locale du virus à la surface cellulaire (figure 16). Ils peuvent également jouer un rôle dans les mécanismes d'infection en *trans*.

❖ DC-SIGN

Plusieurs études épidémiologiques montrent que les cellules dendritiques (DC) de la peau et des muqueuses sont les premières cellules visées par le VIH^{357,358}. L'interaction entre le VIH et les DC a lieu au niveau de gp120 et du récepteur DC-SIGN (cf I-3.1.1.).

La population de cellules dendritiques est hétérogène et, de ce fait, toutes les DC n'expriment pas DC-SIGN. Cependant, elles peuvent alors exprimer d'autres lectines qui jouent le même rôle que DC-SIGN : le récepteur à mannose ou la langérine exprimée à la surface des cellules de Langerhans^{359,360}. Une étude récente a, néanmoins, suggéré que la langérine inhibe la transmission du VIH à travers les muqueuses épithéliales en endocytant le

³⁵⁶ Clapham, P. R. and McKnight, A. (2002) *J Gen Virol* **83** (8), 1809-1829

³⁵⁷ Cameron, P. U., Freudenthal, P. S., Barker, J. M., Gezelter, S., Inaba, K. and Steinman, R. M. (1992) *Science* **257** (5068), 383-387

³⁵⁸ Weissman, D., Li, Y., Ananworanich, J., Zhou, L. J., Adelsberger, J., Tedder, T. F., Baseler, M. and Fauci, A. S. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (3), 826-830

³⁵⁹ Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R. W. and Cunningham, A. L. (2002) *Nat Immunol* **3** (10), 975-983

³⁶⁰ Nguyen, D. G. and Hildreth, J. E. (2003) *Eur J Immunol* **33** (2), 483-493

virus dans des granules de Birbeck³⁶¹ (cf I-3.1.1.). DC-SIGN et le récepteur à mannose sont également présents à la surface de certaines lignées macrophagiques³⁶². Le récepteur DC-SIGNR, homologue de DC-SIGN exprimé à la surface des cellules endothéliales, est également capable de fixer le VIH et d'activer l'infection en *trans*³⁶³.

❖ *MBP (Mannose Binding Proteins)*

Plusieurs protéines interagissent avec les structures riches en mannose de gp120. Par exemple, gp120 est un site potentiel d'attaque par le système immunitaire, notamment par la MBL (*Mannose Binding Lectin*), une lectine multimérique présente dans le sérum³⁶⁴. L'interaction MBL/gp120 favorise la reconnaissance du VIH par le système immunitaire et permet ainsi la neutralisation du virus. Cependant, cette interaction pourrait aussi conduire à la fixation du virus sur des cellules présentant les récepteurs du complément et donc engendrer l'infection de telles cellules³⁶⁵.

❖ *Galactosyl Ceramide (GalCer)*

Dans les premières étapes de l'infection, le VIH s'adsorbe au niveau de la partie apicale des cellules épithéliales. Cette membrane a une composition lipidique caractéristique, avec un feuillet externe enrichi en glycosphingolipides, dont GalCer. Celui-ci est également présent à la surface des DC immatures (cf I-3.1.1.).

Le GalCer participerait à l'établissement de radeaux lipidiques qui permettent les phénomènes d'endocytose et de transcytose, notamment la transcytose du VIH à travers la barrière épithéliale^{366,367} ou les cellules neuronales CD4-négatives³⁶⁸. Il semblerait agir directement sur le VIH en se fixant à gp41, puis à gp120^{369,367}.

❖ *Les héparanes sulfate*

En 1993, des travaux ont montré que le VIH interagit avec les héparanes sulfate (HS)^{370,371}. Puis, Mondor³⁷² a confirmé que le VIH était capable de s'attacher à des cellules

³⁶¹ de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M. A., de Gruijl, T., Piguët, V., van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. B. (2007) *Nat Med* **13** (3), 367-371

³⁶² Nguyen, D. G. and Hildreth, J. E. (2003) *Eur J Immunol* **33** (2), 483-493

³⁶³ Pohlmann, S., Soilleux, E. J., Baribaud, F., Leslie, G. J., Morris, L. S., Trowsdale, J., Lee, B., Coleman, N. and Doms, R. W. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (5), 2670-2675

³⁶⁴ Ji, X., Gewurz, H. and Spear, G. T. (2005) *Mol Immunol* **42** (2), 145-152

³⁶⁵ Thielens, N. M., Tacnet-Delorme, P. and Arlaud, G. J. (2002) *Immunobiology* **205** (4-5), 563-574

³⁶⁶ Bomsel, M. (1997) *Nat Med* **3** (1), 42-47

³⁶⁷ Magerus-Chatinet, A., Yu, H., Garcia, S., Ducloux, E., Terris, B. and Bomsel, M. (2007) *Virology* **362** (1), 67-74

³⁶⁸ Harouse, J. M., Laughlin, M. A., Pletcher, C., Friedman, H. M. and Gonzalez-Scarano, F. (1991) *J Leukoc Biol* **49** (6), 605-609

³⁶⁹ Alfsen, A. and Bomsel, M. (2002) *J Biol Chem* **277** (28), 25649-25659

³⁷⁰ Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C. and Norcross, M. A. (1993) *AIDS Res Hum Retroviruses* **9** (2), 167-174

HeLa *via* des interactions entre gp120 et les HS. Cette interaction a pu être démontrée pour des virus de type X4 et R5X4, mais est moins efficace pour des virus R5, généralement caractérisés par une boucle V3 contenant au plus cinq charges positives. Elle a, en effet, lieu essentiellement entre les régions chargées positivement de la boucle V3 et les groupements sulfate négatifs des HS³⁷³. Depuis, l'implication des HS dans la fixation du VIH a été observée à la surface de nombreux types cellulaires : les cellules endothéliales primaires³⁷⁴, les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique^{375,376}, les lymphocytes T³⁷⁷, les macrophages³⁷⁸. Cette partie sera détaillée dans le chapitre III-3.

❖ *La cyclophiline A*

La cyclophiline A est une protéine cytosolique exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules eucaryotes³⁷⁹. Lors de la réplication du VIH, elle est incorporée dans les particules virales au niveau du précurseur Gag^{380,381}. Sa présence est nécessaire à l'initiation de la transcription inverse. Mis à part ce rôle « post-entrée », une étude a montré que la cyclophiline A est impliquée dans le processus d'entrée virale, notamment en initiant l'attachement du virus *via* des interactions avec les HS cellulaires³⁸². La cyclophiline A est, dans ce cas, exposée à la surface du virus et permet un rapprochement du virus et de la cellule hôte afin d'initier le mécanisme d'entrée classique gp120/CD4/corécepteur. Cependant, des travaux ultérieurs³⁸³ ont conclu que la cyclophiline A n'avait pas d'effet sur l'attachement viral.

❖ *ICAM-1/LFA-1*

Les virions synthétisés, en bourgeonnant d'une cellule, récupèrent une partie de la membrane de la cellule hôte. De ce fait, des interactions peuvent avoir lieu entre des

³⁷¹ Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. and Norcross, M. A. (1995) *J Virol* **69** (4), 2233-2239

³⁷² Mondor, I., Ugolini, S. and Sattentau, Q. J. (1998) *J Virol* **72** (5), 3623-3634

³⁷³ Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) *J Virol* **74** (4), 1948-1960

³⁷⁴ Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2003) *Immunity* **18** (1), 27-39

³⁷⁵ Argyris, E. G., Acheampong, E., Nunnari, G., Mukhtar, M., Williams, K. J. and Pomerantz, R. J. (2003) *J Virol* **77** (22), 12140-12151

³⁷⁶ Bobardt, M. D., Salmon, P., Wang, L., Esko, J. D., Gabuzda, D., Fiala, M., Trono, D., Van der Schueren, B., David, G. and Gallay, P. A. (2004) *J Virol* **78** (12), 6567-6584

³⁷⁷ Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C. and Norcross, M. A. (1993) *AIDS Res Hum Retroviruses* **9** (2), 167-174

³⁷⁸ Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2001) *J Virol* **75** (19), 9187-9200

³⁷⁹ Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M. J. and Foxwell, B. M. (1991) *Immunology* **72** (3), 399-404

³⁸⁰ Franke, E. K., Yuan, H. E. and Luban, J. (1994) *Nature* **372** (6504), 359-362

³⁸¹ Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. and Gottlinger, H. G. (1994) *Nature* **372** (6504), 363-365

³⁸² Saphire, A. C., Bobardt, M. D. and Gallay, P. A. (1999) *Embo J* **18** (23), 6771-6785

³⁸³ Zhang, Y. J., Hatzioannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S. P. and Bieniasz, P. D. (2002) *J Virol* **76** (12), 6332-6343

molécules issues de la cellule hôte à la surface du virion et leur ligand. Par exemple, ICAM-1, parfois détectée à la surface du VIH³⁸⁴, peut favoriser l'attachement du virus aux cellules exprimant l'intégrine LFA-1³⁸⁵. Une étude a notamment montré que ICAM-1 augmente d'un facteur 10 l'infectivité du VIH envers les cellules exprimant LFA-1³⁸⁶.

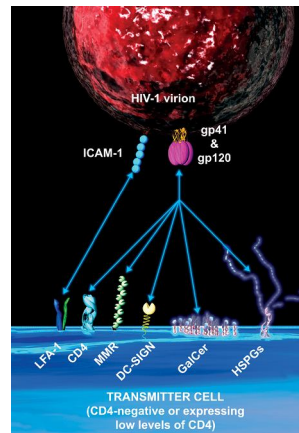


Figure 16 : les récepteurs du VIH-1

Oltre CD4 et CCR5 ou CXCR4, le VIH peut s'adsorber à la surface cellulaire *via* différents récepteurs.

II-3. D'autres modes d'entrée dans les cellules

Il est acquis depuis plusieurs années que le mécanisme classique d'entrée du virus dans les cellules nécessite l'interaction de gp120 avec CD4, puis avec un corécepteur de la famille des récepteurs à chimiokines. Néanmoins, des modes d'entrée parallèles ont été décrits, dans certaines circonstances ou dans certaines cellules.

L'entrée virale peut, par exemple, faire intervenir d'autres récepteurs, jouant notamment un rôle primordial dans l'attachement du virus à la surface des cellules (cf II-2.3.).

Certaines cellules, en particulier les cellules épithéliales, peuvent véhiculer le virus par un phénomène de **transcytose**, de leur partie apicale vers leur membrane basale. Dans ce cas, les cellules constituent uniquement une voie de passage, elles ne sont pas infectées par le virus^{387,388}.

Certains récepteurs alternatifs (cf II-2.3) permettent au virus de s'adsorber à la surface d'une cellule, même non permissive à la réplication virale, pour ensuite être relargué au contact ou à proximité d'une cellule permissive. Ce mécanisme d'**infection en trans** a

³⁸⁴ Paquette, J. S., Fortin, J. F., Blanchard, L. and Tremblay, M. J. (1998) *J Virol* **72** (11), 9329-9336

³⁸⁵ Fortin, J. F., Barbeau, B., Hedman, H., Lundgren, E. and Tremblay, M. J. (1999) *Virology* **257** (1), 228-238

³⁸⁶ Fortin, J. F., Cantin, R., Lamontagne, G. and Tremblay, M. (1997) *J Virol* **71** (5), 3588-3596

³⁸⁷ Bomsel, M. (1997) *Nat Med* **3** (1), 42-47

³⁸⁸ Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., Belec, L., Dupont, C. and Desgranges, C. (1998) *Immunity* **9** (2), 277-287

notamment été décrit pour le récepteur DC-SIGN³⁸⁹ et pour les HS³⁹⁰. Adsorbé à la surface cellulaire par l'intermédiaire de ces récepteurs, le virus est protégé de la dégradation et peut rester infectieux pendant plusieurs jours.

Certains travaux ont mis en évidence le rôle des « **radeaux lipidiques** », des régions de la membrane cellulaire enrichies en glycosphingolipides, sphingomyéline, cholestérol, protéines à ancre GPI et protéines signal, dans l'entrée virale³⁹¹. Ils forment des structures mobiles et instables. Leur taille et leur composition varient selon les types cellulaires et l'état d'activation des cellules. Ces domaines agissent en qualité de plateforme pour le trafic membranaire (endocytose, sécrétion) et la transmission de signaux, en particulier parce qu'ils permettent de concentrer diverses protéines de signalisation ou des récepteurs dans une région bien précise de la membrane³⁹². De nombreuses données indiquent que ces radeaux jouent un rôle important lors de l'entrée du VIH dans une cellule, mais également lors de sa sortie. Des travaux suggèrent notamment que ces domaines permettent une colocalisation de CD4 et des corécepteurs, facilitant l'interaction avec le VIH^{393,394,395,396}. Ce phénomène est, en particulier, important dans les cellules exprimant peu de récepteurs et/ou corécepteurs. Cependant, un certain nombre d'études sont venues contredire ces résultats en démontrant que la localisation de CD4 et CCR5 dans ces domaines lipidiques n'est pas nécessaire à l'infection par le VIH et que les radeaux lipidiques sont enrichis en CD4 mais pas en CCR5³⁹⁷.

Les difficultés d'interprétation pourraient résider dans le fait que les radeaux lipidiques isolés par toutes ces équipes ne reflètent pas l'organisation lipidique réelle de la membrane cellulaire^{398,399}. En effet, ces domaines semblent relativement instables dans les conditions physiologiques. Récemment, une étude basée sur le transfert de fluorescence (FRET) a permis d'étudier la formation du complexe gp120/CD4/CCR5 dans des conditions physiologiques⁴⁰⁰. Ces travaux ont montré que CD4 et CCR5 sont localisés chacun dans des microenvironnements distincts. Sous l'influence de gp120, CD4 et CCR5 colocalisent à la surface cellulaire ; ce mouvement requiert un environnement riche en cholestérol, mais qui

³⁸⁹ Pope, M., Betjes, M. G., Romani, N., Hirmand, H., Cameron, P. U., Hoffman, L., Gezelter, S., Schuler, G. and Steinman, R. M. (1994) *Cell* **78** (3), 389-398

³⁹⁰ Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2003) *Immunity* **18** (1), 27-39

³⁹¹ Resh, M. D. (2004) *Subcell Biochem* **37**, 217-232

³⁹² He, H. T., Lellouch, A. and Marguet, D. (2005) *Semin Immunol* **17** (1), 23-33

³⁹³ Manes, S., del Real, G., Lacalle, R. A., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Sanchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcami, J., Mira, E. and Martinez, A. C. (2000) *EMBO Rep* **1** (2), 190-196

³⁹⁴ Nguyen, D. H. and Taub, D. (2002) *J Immunol* **168** (8), 4121-4126

³⁹⁵ Popik, W., Alce, T. M. and Au, W. C. (2002) *J Virol* **76** (10), 4709-4722

³⁹⁶ Chazal, N. and Gerlier, D. (2003) *Microbiol Mol Biol Rev* **67** (2), 226-237

³⁹⁷ Percherancier, Y., Lagane, B., Planchenault, T., Staropoli, I., Altmeyer, R., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Hoessli, D. C. and Bachelier, F. (2003) *J Biol Chem* **278** (5), 3153-3161

³⁹⁸ Edidin, M. (2003) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 257-283

³⁹⁹ Maxfield, F. R. (2002) *Curr Opin Cell Biol* **14** (4), 483-487

⁴⁰⁰ Yi, L., Fang, J., Isik, N., Chim, J. and Jin, T. (2006) *J Biol Chem* **281** (46), 35446-35453

semble différent des radeaux lipidiques. Une autre étude⁴⁰¹ a conclu que CD4 et CCR5 interagissaient, facilitant la fixation de gp120, et que l'attachement de gp120 augmentait à son tour l'interaction CD4/CCR5. Dans ce cas, il a été montré que ces complexes se formaient en dehors des radeaux lipidiques.

Par ailleurs, plusieurs travaux indiquent que l'assemblage et le bourgeonnement ont également lieu au niveau des radeaux lipidiques. Les protéines gp120 et gp41 s'ancrent notamment dans la membrane au niveau de ces domaines particuliers⁴⁰².

Récemment, de nombreuses recherches se sont focalisées sur le rôle des **synapses virologiques** (VS) dans l'infection par le VIH^{403,404,405}. Dérivé de la synapse neuronale (entre deux neurones) ou immunologique (entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène), le terme de synapse virologique obéit à trois critères : présence d'un contact entre deux cellules sans fusion, formation de jonctions adhésives stables entre les deux cellules et sécrétion de molécules (ici du matériel viral) entre la cellule pré- et la cellule post-synaptique.

Ce mode de dissémination du virus est extrêmement rapide (5 à 10 min) et efficace, puisqu'il réduit les pertes possibles de virus (les virions ne sont pas relâchés dans le milieu extracellulaire) et abolit la neutralisation du virus par le système immunitaire. Deux types de VS ont été décrits : entre deux lymphocytes T^{406,405} ou entre une DC ou un macrophage et un lymphocyte T^{407,408}.

Dans une synapse entre deux lymphocytes T, CD4, les corécepteurs et LFA-1 colocalisent, à la surface de la cellule cible, par un mécanisme actine-dépendant. Dans le lymphocyte infecté, le contact cellulaire semble induire le recrutement des protéines virales Env et Gag, le long de microtubules d'actine et de tubuline, au niveau de radeaux lipidiques à la surface du lymphocyte. La protéine Env interagit alors avec les récepteurs puis les corécepteurs pendant que ICAM-3 et, à moindre échelle, ICAM-1 se fixent à LFA-1 situé sur la cellule post-synaptique, afin de stabiliser la synapse. Enfin, le bourgeonnement des nouveaux virions s'effectue directement dans l'espace synaptique.

⁴⁰¹ Gaibelet, G., Planchenault, T., Mazeret, S., Dumas, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lopez, A., Lagane, B. and Bachelier, F. (2006) *J Biol Chem* **281** (49), 37921-37929

⁴⁰² Lee, Y. M., Liu, B. and Yu, X. F. (1999) *J Virol* **73** (7), 5654-5662

⁴⁰³ Bangham, C. R. (2003) *J Gen Virol* **84** (12), 3177-3189

⁴⁰⁴ Jolly, C. and Sattentau, Q. J. (2004) *Traffic* **5** (9), 643-650

⁴⁰⁵ Jolly, C., Mitar, I. and Sattentau, Q. J. (2007) *J Virol* **81** (11), 5547-5560

⁴⁰⁶ Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M. and Sattentau, Q. J. (2004) *J Exp Med* **199** (2), 283-293

⁴⁰⁷ McDonald, D., Wu, L., Bohks, S. M., KewalRamani, V. N., Unutmaz, D. and Hope, T. J. (2003) *Science* **300** (5623), 1295-1297

⁴⁰⁸ Turville, S. G., Santos, J. J., Frank, I., Cameron, P. U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stossel, H., Romani, N., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Pope, M. and Cunningham, A. L. (2004) *Blood* **103** (6), 2170-2179

Dans une synapse entre une DC ou un macrophage et un lymphocyte T, les virions internalisés par la DC ou le macrophage semblent se relocaliser à proximité du site de contact, alors que la surface du lymphocyte s'enrichit localement en récepteurs CD4, CCR5 et CXCR4⁴⁰⁹. Les mécanismes précis de cette synapse particulière restent néanmoins inconnus à l'heure actuelle. Il semblerait que DC-SIGN, en se fixant à son ligand ICAM-3, situé sur le lymphocyte, contribue, au moins partiellement, au rapprochement des cellules⁴¹⁰. D'autres éléments, tels que le facteur LARG (*Rho guanine nucleotide-exchange factor*)⁴¹¹ ou les tétraspanines⁴¹² (protéines qui participent à la présentation des antigènes et la formation des synapses immunologiques), semblent également être recrutés au niveau de la synapse DC-lymphocyte T.

Récemment, des études ont montré que le VIH affectait la formation des synapses immunologiques^{413,414}. Dans des conditions physiologiques normales, les lymphocytes T au repos rencontrent des CPA et forment des synapses immunologiques, conduisant à l'activation des lymphocytes T, la production de cytokines, la prolifération et la différenciation et, plus tard, à l'apoptose. En revanche, les lymphocytes T infectés par le VIH forment, d'une part, des synapses immunologiques transmettant des signaux altérés et produisent, d'autre part, un fort taux d'IL-2. Ces deux phénomènes pourraient réduire l'apoptose des lymphocytes T infectés, stimulant ainsi la réplication et la transmission du VIH⁴¹⁴.

⁴⁰⁹ McDonald, D., Wu, L., Bohks, S. M., KewalRamani, V. N., Unutmaz, D. and Hope, T. J. (2003) *Science* **300** (5623), 1295-1297

⁴¹⁰ Arrighi, J. F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J. M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T. B. and Piguet, V. (2004) *J Exp Med* **200** (10), 1279-1288

⁴¹¹ Hodges, A., Sharrocks, K., Edelmann, M., Baban, D., Moris, A., Schwartz, O., Drakesmith, H., Davies, K., Kessler, B., McMichael, A. and Simmons, A. (2007) *Nat Immunol* **8** (6), 569-577

⁴¹² Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J. F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J. M., Demareux, N., Marsh, M. and Piguet, V. (2005) *Traffic* **6** (6), 488-501

⁴¹³ Thoulouze, M. I., Sol-Foulon, N., Blanchet, F., Dautry-Varsat, A., Schwartz, O. and Alcover, A. (2006) *Immunity* **24** (5), 547-561

⁴¹⁴ Fackler, O. T., Alcover, A. and Schwartz, O. (2007) *Nat Rev Immunol* **7** (4), 310-317

III- ROLE DES HSPG DANS L'INFECTION PAR LE VIH

Les protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate (HSPG) sont des molécules complexes constituées d'un core protéique qui porte une ou plusieurs chaînes d'HS, des polysaccharides linéaires appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAG). Bien que certains aient une localisation intracellulaire, la plupart des HSPG, et des protéoglycanes (PG) de façon générale, sont présents en abondance dans les matrices interstitielles ainsi qu'à la surface cellulaire, où ils participent à la formation du glycocalix. Ils interagissent avec une multitude de ligands et cette faculté leur confère un rôle essentiel dans divers processus biologiques. Ils contribuent ainsi à l'édification de la matrice extracellulaire, tout en lui attribuant de nombreuses propriétés : contrôle de la migration, de l'adhésion et de la différenciation cellulaire, établissement de gradients chimiotactiques, contrôle de la coagulation et du métabolisme des lipides, maintien de l'hydratation de la matrice^{415,416,417,418}.

De nombreux micro-organismes pathogènes ont développé la capacité d'utiliser les chaînes polysaccharidiques des PG comme site d'ancrage sur la cellule. C'est le cas de beaucoup de virus, notamment le VIH qui exploite les propriétés fixatrices des HSPG pour s'adsorber à la surface des cellules.

III-1. Structure et fonction des HSPG

III-1.1. Généralités sur les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes

Les PG sont des protéines qui portent des chaînes de GAG, liées de façon covalente. Ils sont classés selon la nature de leurs chaînes polysaccharidiques : protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate (HSPG), de chondroïtine sulfate (CSPG), de dermatane sulfate (DSPG) ou de kératane sulfate (KSPG). Il existe un seul PG à chaîne d'héparine, la serglycine.

Ces **chaînes de GAG** sont constituées par la répétition d'un motif disaccharidique de base, composé d'un acide uronique (ou d'un galactose dans le cas du KS) et d'une hexosamine N-substituée (glucosamine ou galactosamine). Elles subissent différentes modifications (épimérisation, N- et O-sulfatations), qui génèrent une grande diversité moléculaire. L'héparine, bien connue en médecine pour ses propriétés anticoagulantes, est essentiellement produite par les mastocytes. Les HS, analogues moins sulfatés de l'héparine, sont exprimés sur toutes les cellules. Les HS et l'Hp suivent la même voie de biosynthèse (cf III-1.3.1.). La CS et le DS, comme les HS, sont présents à la surface cellulaire et dans les

⁴¹⁵ Hardingham, T. and Bayliss, M. (1990) *Semin Arthritis Rheum* **20** (3), 12-33

⁴¹⁶ Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991) *Annu Rev Biochem* **60**, 443-475

⁴¹⁷ Bourin, M. C. and Lindahl, U. (1993) *Biochem J* **289** (2), 313-330

⁴¹⁸ Salmivirta, M., Lidholt, K. and Lindahl, U. (1996) *Faseb J* **10** (11), 1270-1279

matrices interstitielles. Le KS, tout d'abord isolé de la cornée, est également un constituant du cartilage. Il existe un cinquième type de GAG, l'acide hyaluronique (HA), qui n'est pas rattaché à un core protéique et ne subit pas de modification enzymatique. Présent dans la matrice extracellulaire de nombreux tissus, il est impliqué dans le maintien des tissus conjonctifs⁴¹⁹. De nombreux PG peuvent porter deux types de chaînes polysaccharidiques et la taille ainsi que la composition de ces chaînes varient au cours du développement, du temps ou lors de pathologies. Les chaînes de GAG interagissent avec de nombreux ligands et, dans la plupart des cas, les propriétés fonctionnelles des PG dépendent de la nature de leurs chaînes saccharidiques.

Le **core protéique** des PG détermine généralement leur localisation et le degré d'expression des chaînes polysaccharidiques. Les PG extracellulaires possèdent classiquement des chaînes de DS et CS et sont impliqués dans le maintien de l'intégrité des tissus conjonctifs. En revanche, les PG situés à la surface cellulaire possèdent essentiellement des chaînes d'HS et quelques chaînes de CS et agissent souvent en tant que récepteurs et régulateurs de différentes voies de signalisation. Certaines régions du core protéique sont extrêmement conservées, suggérant des fonctions spécifiques.

III-1.2. Le core protéique des HSPG

La classification des HSPG se fait selon la nature de leur core protéique : il existe cinq classes majeures de cores protéiques (qui représentent 95% des HSPG) dont la taille varie de 32 à 500 kDa⁴²⁰ : les **syndécans** et les **glypicans** sont accrochés à la membrane cellulaire, le **perlécan**, l'**agrine** et le **collagène XVIII** sont présents dans la matrice extracellulaire, sous forme soluble. On trouve, de plus, quelques formes d'HSPG minoritaires telles que le CD44E, le bétaglycan ou encore le testican⁴²¹.

III-1.2.1. Les HSPG membranaires

A la surface cellulaire, deux sous-familles principales d'HSPG, les syndécans et les glypicans, diffèrent par la séquence de leur core protéique et leur mode d'ancrage dans la membrane cellulaire⁴²². Ces deux types d'HSPG possèdent un core protéique de taille modeste (20-45 kDa pour les syndécans et 60-70 kDa pour les glypicans).

⁴¹⁹ Volpi, N. (2006) *Curr Med Chem* **13** (15), 1799-1810

⁴²⁰ Esko, J. D. and Selleck, S. B. (2002) *Annu Rev Biochem* **71**, 435-471

⁴²¹ Iozzo, R. V. (2001) *J Clin Invest* **108** (2), 165-167

⁴²² Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 729-777

❖ Les syndécans

Les syndécans sont généralement les principaux HSPG exprimés à la surface des cellules (figure 17). Ce sont des HSPG transmembranaires, composés d'un peptide signal N-terminal, d'un domaine extracellulaire possédant 3 à 5 séquences consensus pour l'attachement de chaînes de GAG, d'un domaine transmembranaire (24-25 acides aminés) et d'un court domaine C-terminal cytoplasmique (28-34 acides aminés).

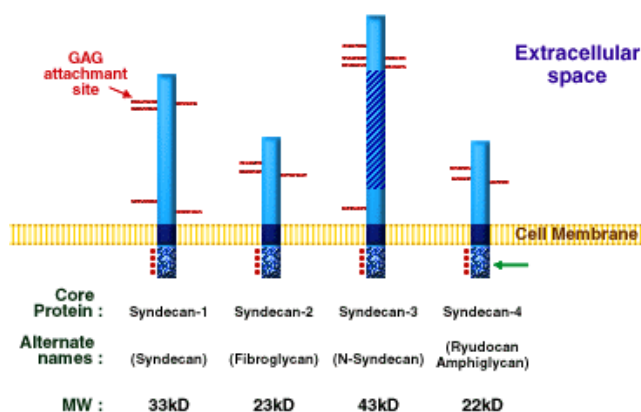


Figure 17 : représentation schématique des différents syndécans

Les syndécans sont constitués d'un domaine cytoplasmique comprenant une région variable et deux régions conservées, d'un domaine transmembranaire relativement bien conservé, et d'un domaine extracellulaire portant les sites d'attachement des chaînes de GAG.

Source : <http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/PG-A02/syndecanE.html>

Quatre syndécans ont été observés chez les mammifères (figure 17) : le syndécan-1 ou syndécan⁴²³, le syndécan-2 ou fibroglycan⁴²⁴, le syndécan-3 ou N-syndécan^{425,426} et le syndécan-4 ou amphiglycan/ryudocan⁴²⁷. Les domaines cytoplasmiques et transmembranaires de ces différents membres sont fortement conservés ; les divergences sont situées au niveau des domaines extracellulaires ou seuls les sites d'attachement des GAG sont conservés. Ces sites sont situés aux 2 extrémités du domaine extracellulaire pour les syndécans-1 et -3, alors que les syndécans-2 et -4 portent des chaînes uniquement sur la partie distale du domaine extracellulaire. Les chaînes polysaccharidiques, de 20 à 80 disaccharides de long⁴²⁸, s'attachent classiquement aux résidus sérines des dipeptides Ser-Gly, des séquences consensus particulières^{429,430}.

⁴²³ Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S. and Bernfield, M. (1989) *J Cell Biol* **108** (4), 1547-1556

⁴²⁴ Marynen, P., Zhang, J., Cassiman, J. J., Van den Berghe, H. and David, G. (1989) *J Biol Chem* **264** (12), 7017-7024

⁴²⁵ Carey, D. J., Evans, D. M., Stahl, R. C., Asundi, V. K., Conner, K. J., Garbes, P. and Cizmeci-Smith, G. (1992) *J Cell Biol* **117** (1), 191-201

⁴²⁶ Gould, S. E., Upholt, W. B. and Kosher, R. A. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (8), 3271-3275

⁴²⁷ David, G., van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J. J. and van den Berghe, H. (1992) *J Cell Biol* **118** (4), 961-969

⁴²⁸ Tkachenko, E., Rhodes, J. M. and Simons, M. (2005) *Circ Res* **96** (5), 488-500

⁴²⁹ Bourdon, M. A. and Ruoslahti, E. (1989) *J Cell Biol* **108** (3), 1149-1155

Le domaine cytoplasmique, en particulier la région proche de la membrane, bien conservée parmi tous les syndécans, ainsi que le domaine transmembranaire semblent impliqués dans la dimérisation des syndécans. En effet, tous les syndécans existent probablement sous forme de dimères ou d'oligomères^{431,432,433}. Ces oligomères ont néanmoins principalement été décrits pour des syndécans portant des chaînes d'HS relativement courtes ou totalement dépourvus de chaînes saccharidiques⁴³⁴.

Toutes les cellules expriment au moins une forme de syndécan, la plupart plusieurs. Le profil d'expression varie en fonction du type cellulaire, du tissu⁴³⁵ ainsi qu'au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Par exemple, le cerveau exprime presque exclusivement le syndécan-3, les reins de préférence le syndécan-4 et le foie présente de forts taux de syndécan-1, -2 et -4 mais pas de syndécan-3.

Outre les divergences au niveau du core protéique, les modifications du nombre, du type, de la longueur et de la structure des GAG attachés génèrent un deuxième degré de variation. En effet, la majorité des chaînes de GAG ajoutées au core protéique des syndécans sont de type HS ; cependant, les syndécans-1 et -4 portent également des chaînes de CS ou DS^{436,437}. Dans le syndécan-1, les sites proches de la membrane sont généralement modifiés par des CS alors que les sites N-terminaux portent préférentiellement des HS⁴³⁸. Aucune spécificité de ce genre n'a été observée pour le syndécan-4. Le choix du type de GAG a des conséquences fonctionnelles importantes : bien que les CS soient globalement plus chargées négativement, les HS ont une meilleure affinité pour la plupart des ligands extracellulaires.

Exprimés en abondance à la surface des cellules, les syndécans contribuent à la formation du glycocalix, une couche de polyholosides principalement constituée de glycoprotéines, de glycolipides et de protéoglycanes qui forment une véritable « forêt » à la surface des cellules. Les syndécans interagissent avec de nombreux ligands extracellulaires, participant ainsi à diverses fonctions biologiques telles que l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaires, le métabolisme lipidique et l'infection par différents pathogènes⁴³⁹.

⁴³⁰ Esko, J. D. and Zhang, L. (1996) *Curr Opin Struct Biol* **6** (5), 663-670

⁴³¹ Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S. and Bernfield, M. (1989) *J Cell Biol* **108** (4), 1547-1556

⁴³² Oh, E. S., Woods, A. and Couchman, J. R. (1997) *J Biol Chem* **272** (18), 11805-11811

⁴³³ Lee, D., Oh, E. S., Woods, A., Couchman, J. R. and Lee, W. (1998) *J Biol Chem* **273** (21), 13022-13029

⁴³⁴ Sanderson, R. D., Hinkes, M. T. and Bernfield, M. (1992) *J Invest Dermatol* **99** (4), 390-396

⁴³⁵ Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L. and Bernfield, M. (1994) *Mol Biol Cell* **5** (7), 797-805

⁴³⁶ Rapraeger, A., Jalkanen, M., Endo, E., Koda, J. and Bernfield, M. (1985) *J Biol Chem* **260** (20), 11046-11052

⁴³⁷ Shworak, N. W., Shirakawa, M., Mulligan, R. C. and Rosenberg, R. D. (1994) *J Biol Chem* **269** (33), 21204-21214

⁴³⁸ Kokenyesi, R. and Bernfield, M. (1994) *J Biol Chem* **269** (16), 12304-12309

⁴³⁹ Park, P. W., Pier, G. B., Preston, M. J., Goldberger, O., Fitzgerald, M. L. and Bernfield, M. (2000) *J Biol Chem* **275** (5), 3057-3064

En séquestrant des ligands à la surface cellulaire, ils les concentrent et facilitent leur interaction avec des récepteurs de signalisation ; ce rôle a notamment été démontré dans l'adsorption de nombreux virus à la surface de leurs cellules cibles. Ils participent également à la dimérisation de certaines protéines, en particulier des chimiokines, des cytokines et des facteurs de croissance. Certains de ces mécanismes sont détaillés dans le chapitre III-1.4.1.

❖ *Les glypicans*

Les glypicans (Gpc) sont des HSPG reliés à la membrane cellulaire par une ancre glycoposphatidylinositol (GPI)⁴⁴⁰. Six gènes de la famille des glypicans ont été observés chez les mammifères, deux chez *D. melanogaster* et un chez *C. elegans*. Tous les glypicans présentent une structure modulaire, avec un domaine extracellulaire globulaire riche en cystéines. Ils possèdent 2 à 3 sites d'attachement de chaînes d'HS (*via* la séquence consensus Asn-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly) dans les 50 derniers acides aminés de la partie C-terminale, à proximité de la membrane cellulaire^{441,442}.

De façon générale, les glypicans sont exprimés principalement au cours du développement^{443,444}. Leur niveau d'expression varie en fonction du stade de développement et selon les tissus, suggérant que les glypicans sont impliqués dans la régulation de la morphogénèse^{445,444}. Des mutations dans le gène codant pour le glypican-3 sont associées au syndrome de Simpson-Golabi-Behmel, une pathologie qui entraîne une croissance squelettique et viscérale anormale⁴⁴⁶. Par ailleurs, l'expression des glypicans est souvent associée aux cancers^{447,448}. En particulier, le glypican-3 pourrait constituer un marqueur tumoral des hépatocarcinomes puisque son expression est augmentée dans les cellules cancéreuses⁴⁴⁹.

⁴⁴⁰ Iozzo, R. V. (2001) *J Clin Invest* **108** (2), 165-167

⁴⁴¹ Liang, Y., Haring, M., Roughley, P. J., Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1997) *J Cell Biol* **139** (4), 851-864

⁴⁴² Veugeliers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., Bruystens, A. M., Coomans, C., Durr, J., Vermeesch, J., Marynen, P. and David, G. (1999) *J Biol Chem* **274** (38), 26968-26977

⁴⁴³ Ivins, J. K., Litwack, E. D., Kumbasar, A., Stipp, C. S. and Lander, A. D. (1997) *Dev Biol* **184** (2), 320-332

⁴⁴⁴ Litwack, E. D., Ivins, J. K., Kumbasar, A., Paine-Saunders, S., Stipp, C. S. and Lander, A. D. (1998) *Dev Dyn* **211** (1), 72-87

⁴⁴⁵ Saunders, S., Paine-Saunders, S. and Lander, A. D. (1997) *Dev Biol* **190** (1), 78-93

⁴⁴⁶ Pilia, G., Hughes-Benzie, R. M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E. Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A. and Schlessinger, D. (1996) *Nat Genet* **12** (3), 241-247

⁴⁴⁷ Matsuda, K., Maruyama, H., Guo, F., Kleeff, J., Itakura, J., Matsumoto, Y., Lander, A. D. and Korc, M. (2001) *Cancer Res* **61** (14), 5562-5569

⁴⁴⁸ Sung, Y. K., Hwang, S. Y., Park, M. K., Farooq, M., Han, I. S., Bae, H. I., Kim, J. C. and Kim, M. (2003) *Cancer Sci* **94** (3), 259-262

⁴⁴⁹ Capurro, M., Wanless, I. R., Sherman, M., Deboer, G., Shi, W., Miyoshi, E. and Filmus, J. (2003) *Gastroenterology* **125** (1), 89-97

❖ Les autres HSPG membranaires

Il existe également d'autres HSPG membranaires mineurs tels que le betaglycan⁴⁵⁰. C'est un PG qui porte des chaînes d'HS et de CS. Il est connu pour se fixer au TGF- β *via* son core protéique et au FGF-2 *via* ses chaînes d'HS⁴⁵¹.

Certaines protéines, dans des conditions particulières, peuvent également être modifiées par l'addition de chaînes d'HS : c'est notamment le cas de CD44E (ou épican) issu de l'épissage alternatif de CD44, un récepteur multifonctionnel situé à la surface cellulaire, connu pour son interaction avec l'acide hyaluronique. Cette isoforme possède des sites d'ancrage pour des chaînes d'HS. Elle est exprimée à la surface des monocytes et est impliquée dans la régulation des facteurs de croissance au cours de la réaction inflammatoire et du processus de cicatrisation^{452,453}.

Une isoforme particulière d'un récepteur des FGF, le FGFR2, possédant une chaîne d'HS a également été décrite^{454,455,456}. Cette chaîne d'HS augmente l'affinité du récepteur FGFR-2 pour le ligand FGF-1 et accroît l'autophosphorylation du récepteur, amplifiant ainsi la cascade de réponse au FGF⁴⁵⁵.

III-1.2.2. Les HSPG matriciels

Les cellules qui produisent la membrane basale sécrètent des HSPG : les trois principaux HSPG matriciels caractérisés sont le collagène XVIII, le perlécan et l'agrine^{457,458}. Ces HSPG, situés dans la matrice extracellulaire, se distinguent par leurs cores protéiques.

Le **collagène XVIII** est constitué d'un domaine central en triple hélice (qui permet un haut degré de flexibilité), interrompu et bordé de régions non collagéniques, qui portent plusieurs chaînes d'HS, au niveau de dipeptides Ser-Gly. Exprimé dans la membrane basale et dans le cartilage, il y joue un rôle dans l'organisation structurale en se liant à la matrice sous-jacente et en interagissant avec de nombreuses protéines⁴⁵⁹. Il fixe notamment, *via* ses chaînes d'HS, divers facteurs de croissance, des molécules d'adhésion, le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) ainsi que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et intervient, de ce fait, dans la modulation des facteurs de croissance, l'adhésion cellulaire et l'activité

⁴⁵⁰ Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991) *Annu Rev Biochem* **60**, 443-475

⁴⁵¹ Andres, J. L., DeFalcis, D., Noda, M. and Massague, J. (1992) *J Biol Chem* **267** (9), 5927-5930

⁴⁵² Rabenstein, D. L. (2002) *Nat Prod Rep* **19** (3), 312-331

⁴⁵³ Taylor, K. R. and Gallo, R. L. (2006) *Faseb J* **20** (1), 9-22

⁴⁵⁴ Takagi, Y., Shrivastav, S., Miki, T. and Sakaguchi, K. (1994) *J Biol Chem* **269** (38), 23743-23749

⁴⁵⁵ Sakaguchi, K., Lorenzi, M. V., Bottaro, D. P. and Miki, T. (1999) *Mol Cell Biol* **19** (10), 6754-6764

⁴⁵⁶ Barnard, J. C., Williams, A. J., Rabier, B., Chassande, O., Samarut, J., Cheng, S. Y., Bassett, J. H. and Williams, G. R. (2005) *Endocrinology* **146** (12), 5568-5580

⁴⁵⁷ Halfter, W., Dong, S., Schurer, B. and Cole, G. J. (1998) *J Biol Chem* **273** (39), 25404-25412

⁴⁵⁸ Iozzo, R. V. (2001) *J Clin Invest* **108** (2), 165-167

⁴⁵⁹ Pufe, T., Petersen, W., Kurz, B., Tsokos, M., Tillmann, B. and Mentlein, R. (2003) *J Orthop Res* **21** (4), 610-616

angiogénique. Il pourrait également avoir un rôle dans la maladie d'Alzheimer⁴⁶⁰.

Le **perlécan** est constitué de 5 modules protéiques impliqués dans le métabolisme nutritif, l'adhésion et le contrôle de la croissance^{461,462}. Exprimé dans la membrane basale de la plupart des cellules épithéliales et endothéliales ainsi que dans le cartilage, il peut également être associé à la surface cellulaire par des interactions avec des intégrines. Interagissant avec de nombreuses protéines par l'intermédiaire des HS (FGF-2, PDGF, VEGF, laminine-1, collagène IV, fibronectine, IFN γ ...), il est impliqué, comme le collagène XVIII, dans un grand nombre de processus biologiques, dont l'athérosclérose, l'angiogénèse et le cancer⁴⁶³.

Le perlécan et le collagène XVIII possèdent, de plus, des peptides C-terminaux clivables, respectivement l'endorépelline et l'endostatine, qui ont des propriétés anti-angiogéniques. Ces deux fragments peuvent interagir l'un avec l'autre et, dans ce cas, leurs potentiels anti-angiogéniques semblent s'annuler⁴⁶⁴.

Enfin, l'**agrine** est un constituant abondant de la membrane basale qui a une fonction spécialisée dans les jonctions neuromusculaires⁴⁶⁵. Au moins 3 chaînes d'HS sont fixées sur le core protéique de 225 kDa, d'où une masse moléculaire apparente de 600 kDa.

III-1.2.3. Le cas de la serglycine : un protéoglycane intracellulaire

La serglycine est le seul protéoglycane intracellulaire connu. Son core protéique est constitué d'une répétition de 8 dipeptides Ser-Gly, dans lesquels les résidus sérine sont des sites d'attachement pour les chaînes de GAG. Il en résulte une structure particulière, riche en chaînes saccharidiques. La longueur des chaînes de GAG varie selon le type cellulaire.

La serglycine est majoritairement présente dans les mastocytes ; elle porte alors des chaînes d'héparine de 60 à 100 kDa de long⁴⁶⁶. Suite à leur synthèse, ces chaînes d'héparine sont clivées en divers points et les fragments résultants (5 à 25 kDa) sont stockés dans les granules de sécrétion des mastocytes, en complexe avec des protéases. Ces fragments sont relargués au cours des réactions inflammatoires. La serglycine a aussi été détectée, à moindre échelle, dans d'autres cellules d'origine hématopoïétique telles que les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes T cytotoxiques et les plaquettes⁴⁶⁷. Elle a enfin été identifiée

⁴⁶⁰ van Horssen, J., Wilhelmus, M. M., Heljasvaara, R., Pihlajaniemi, T., Wesseling, P., de Waal, R. M. and Verbeek, M. M. (2002) *Brain Pathol* **12** (4), 456-462

⁴⁶¹ Dolan, M., Horchar, T., Rigatti, B. and Hassell, J. R. (1997) *J Biol Chem* **272** (7), 4316-4322

⁴⁶² Friedrich, M. V., Gohring, W., Morgelin, M., Brancaccio, A., David, G. and Timpl, R. (1999) *J Mol Biol* **294** (1), 259-270

⁴⁶³ Iozzo, R. V. and San Antonio, J. D. (2001) *J Clin Invest* **108** (3), 349-355

⁴⁶⁴ Mongiat, M., Sweeney, S. M., San Antonio, J. D., Fu, J. and Iozzo, R. V. (2003) *J Biol Chem* **278** (6), 4238-4249

⁴⁶⁵ Bezakova, G. and Ruegg, M. A. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (4), 295-308

⁴⁶⁶ Robinson, H. C., Horner, A. A., Hook, M., Ogren, S. and Lindahl, U. (1978) *J Biol Chem* **253** (19), 6687-6693

⁴⁶⁷ Kolset, S. O., Prydz, K. and Pejler, G. (2004) *Biochem J* **379** (2), 217-227

dans les cellules endothéliales⁴⁶⁸, les cellules acineuses pancréatiques⁴⁶⁹ et les cellules souches embryonnaires⁴⁷⁰. Dans toutes ces cellules, la serglycine porte des chaînes de CS⁴⁷¹. Néanmoins, certaines lignées cellulaires tumorales hématopoïétiques produisent de la serglycine possédant un faible pourcentage de chaînes d'HS⁴⁷².

III-1.3. Propriétés structurales des chaînes d'HS

Les chaînes d'HS et d'héparine sont composées de répétitions d'un motif de base, constitué d'un acide D-glucuronique (GlcA) et d'une N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) (figure 18). Ces deux membres de la famille des GAG suivent la même voie de biosynthèse, l'héparine subit ensuite un plus grand nombre de modifications enzymatiques, d'où son plus haut niveau de sulfatation.

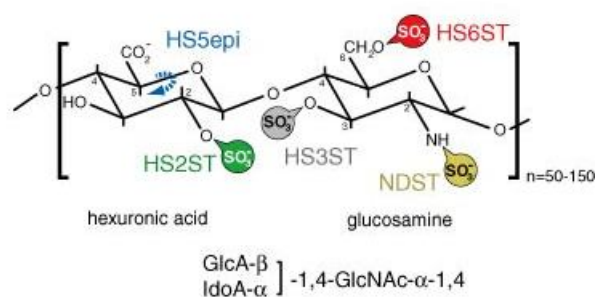


Figure 18 : motif disaccharidique de base des héparanes sulfate⁴⁷²

III-1.3.1. Biosynthèse des chaînes d'HS

La synthèse des chaînes d'HS/Hp s'effectue en trois phases : l'initiation de la chaîne, l'élongation et les modifications post-synthétiques (figure 19).

⁴⁶⁸ Schick, B. P., Gradowski, J. F. and San Antonio, J. D. (2001) *Blood* **97** (2), 449-458

⁴⁶⁹ Biederbick, A., Licht, A. and Kleene, R. (2003) *Eur J Cell Biol* **82** (1), 19-29

⁴⁷⁰ Schick, B. P., Ho, H. C., Brodbeck, K. C., Wrigley, C. W. and Klimas, J. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1593**, 259-267

⁴⁷¹ Kolset, S. O., Prydz, K. and Pejler, G. (2004) *Biochem J* **379** (2), 217-227

⁴⁷² Bulow, H. E. and Hobert, O. (2004) *Neuron* **41** (5), 723-736

Conjointement à la polymérisation, la chaîne polysaccharidique est modifiée par une série d'enzymes : des N-déacétylases/N-sulfotransférases (NDST), la C5-épimérase et des O-sulfotransférases. Ces modifications sont réalisées de façon organisée, pour générer un polysaccharide sulfaté mature.

La transformation des chaînes d'HS débute par le remplacement de certains groupes N-acétyl en C2 des GlcNAc par des groupements sulfate. Cette N-déacétylation/N-sulfatation est la modification pré-requise pour toutes les réactions ultérieures, la C5-épimérase et les O-sulfotransférases nécessitant un environnement riche en N-sulfate pour reconnaître leur substrat⁴⁷⁹. Il s'agit donc d'une étape essentielle dans la régulation de la structure des chaînes d'HS.

Cette N-déacétylation/N-sulfatation est suivie d'une C5-épimérisation des GlcA en IdoA, puis de O-sulfatations variables : 2-O-sulfatation des acides uroniques (principalement des IdoA), 6-O-sulfatation et, occasionnellement, 3-O-sulfatation des glucosamines⁴⁸⁰. L'action concertée et séquentielle de ces enzymes résulte en la formation des domaines NS, hautement sulfatés, des régions NA, non sulfatées, et des domaines de transition N/S⁴⁸¹.

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des HS jouent donc un rôle crucial dans la génération de chaînes d'HS de structures extrêmement variables. Elles sont regroupées en complexes fonctionnels dans l'appareil de Golgi⁴⁸² et, à l'exception de la C5-épimérase et de la 2-O-sulfotransférase, existent sous plusieurs isoformes différant de par leur spécificité de substrat et leur profil d'expression. Le rôle de ces enzymes dans la fonction des HS a été abondamment étudié, notamment par la réalisation de souris invalidées pour l'expression d'une ou plusieurs enzymes⁴⁸³.

Quatre formes de la **NDST** ont été décrites, chacune issue d'un gène différent et ayant des fonctions légèrement distinctes^{484,485,486}. Elles jouent un rôle essentiel dans la régulation des modifications ultérieures des chaînes d'HS. Les NDST-1 et -2 sont les deux formes les plus abondamment exprimées⁴⁸⁷. La NDST-2 participerait à la voie de biosynthèse de

⁴⁷⁹ Gallagher, J. T., Turnbull, J. E. and Lyon, M. (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**, 49-57

⁴⁸⁰ Esko, J. D. and Lindahl, U. (2001) *J Clin Invest* **108** (2), 169-173

⁴⁸¹ Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (1998) *J Biol Chem* **273** (39), 24979-24982

⁴⁸² Pinhal, M. A., Smith, B., Olson, S., Aikawa Ji, J., Kimata, K. and Esko, J. D. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (23), 12984-12989

⁴⁸³ Forsberg, E. and Kjellen, L. (2001) *J Clin Invest* **108** (2), 175-180

⁴⁸⁴ Hashimoto, Y., Orellana, A., Gil, G. and Hirschberg, C. B. (1992) *J Biol Chem* **267** (22), 15744-15750

⁴⁸⁵ Eriksson, I., Sandback, D., Ek, B., Lindahl, U. and Kjellen, L. (1994) *J Biol Chem* **269** (14), 10438-10443

⁴⁸⁶ Aikawa, J. and Esko, J. D. (1999) *J Biol Chem* **274** (5), 2690-2695

⁴⁸⁷ Esko, J. D. and Selleck, S. B. (2002) *Annu Rev Biochem* **71**, 435-471

l'héparine^{488,489} et à celle des HS alors que la NDST-1 interviendrait uniquement dans la modification des chaînes d'HS. Des chercheurs ont émis l'hypothèse qu'en absence de NDST-1, la NDST-2 pourrait être surexprimée de façon à compenser le manque de NDST-1 dans la biosynthèse des HS⁴⁹⁰. Cependant, une étude récente, réalisée sur des foies d'embryons de souris semble réfuter cette hypothèse⁴⁹¹ : chez les embryons de souris déficients en NDST-1, le taux d'expression de la NDST-2 ne semble pas varier. Les résultats obtenus ont, par ailleurs, permis de définir que la NDST-1 participe à 60% de l'activité N-déacétylase/N-sulfotransférase alors que la NDST-2 y contribue à 40%.

La **C5-épipimérase**⁴⁹² et la **2-O-sulfotransférase** ou HS2ST⁴⁹³ n'existent que sous une seule forme. La C5-épipimérase convertit les GlcA en IdoA de façon réversible, conduisant à un équilibre entre les deux épimères. L'épimérisation fournit le substrat nécessaire à la HS2ST, qui ajoute des sulfates sur les IdoA des chaînes d'HS et agit peu sur les GlcA. Il a été proposé que ces deux enzymes forment un complexe et exercent une action concertée, probablement de façon à ce que la C5-épipimérase forme les IdoA et la HS2ST les sulfate immédiatement pour qu'ils ne retournent pas à l'état de GlcA⁴⁹⁴.

Enfin, quatre isoformes de la **6-O-sulfotransférase** (HS6ST) et 7 isoformes de la **3-O-sulfotransférase** (HS3ST) ont été décrites^{495,494}. Les isoformes de la HS6ST présentent des spécificités de substrat relativement proches. En revanche, chacune des isoformes de la HS3ST reconnaît préférentiellement certaines structures saccharidiques autour de la glucosamine à sulfater⁴⁹⁶ et génère, de ce fait, des motifs particuliers, souvent impliqués dans des processus biologiques importants (motif de fixation à l'antithrombine III, cf III-1.4. ; à la glycoprotéine gD du HSV-1, cf III-2.2.).

III-1.3.2. Organisation moléculaire des HS

Les modifications post-synthétiques subies par une chaîne d'HS et, particulièrement les N- et O-sulfatations, se font au niveau de séquences ciblées le long du polysaccharide et entraînent la formation de régions particulières : les domaines NS, N/S et NA (figure 20).

⁴⁸⁸ Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L. and Kjellen, L. (1999) *Nature* **400** (6746), 773-776

⁴⁸⁹ Ledin, J., Staatz, W., Li, J. P., Gotte, M., Selleck, S., Kjellen, L. and Spillmann, D. (2004) *J Biol Chem* **279** (41), 42732-42741

⁴⁹⁰ Kjellen, L. (2003) *Biochem Soc Trans* **31** (2), 340-342

⁴⁹¹ Ledin, J., Ringvall, M., Thuvesson, M., Eriksson, I., Wilen, M., Kusche-Gullberg, M., Forsberg, E. and Kjellen, L. (2006) *J Biol Chem* **281** (47), 35727-35734

⁴⁹² Crawford, B. E., Olson, S. K., Esko, J. D. and Pinhal, M. A. (2001) *J Biol Chem* **276** (24), 21538-21543

⁴⁹³ Bai, X. and Esko, J. D. (1996) *J Biol Chem* **271** (30), 17711-17717

⁴⁹⁴ Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (2003) *Curr Opin Struct Biol* **13** (5), 605-611

⁴⁹⁵ Sugahara, K. and Kitagawa, H. (2002) *IUBMB Life* **54** (4), 163-175

⁴⁹⁶ Liu, J., Shworak, N. W., Sinay, P., Schwartz, J. J., Zhang, L., Fritze, L. M. and Rosenberg, R. D. (1999) *J Biol Chem* **274** (8), 5185-5192

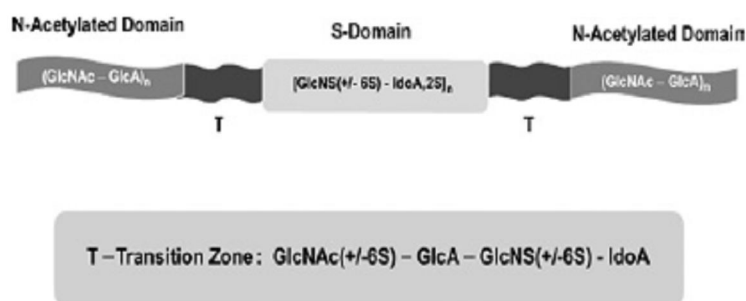


Figure 20 : organisation moléculaire des HS⁴⁹⁷

Les HS sont organisés en domaines NS, fortement sulfatés, flanqués de domaines de transition T ou N/S moins riches en groupements sulfate. Des régions NA, non modifiées, encadrent les domaines NS et N/S.

Les **domaines NS** sont fortement chargés négativement du fait de leurs sulfates et interagissent ainsi avec les régions basiques de protéines ligands. L'héparine, fortement sulfatée, est constituée à 80% de domaines NS. Au sein de ces régions variant de 2 à 7/8 disaccharides, la proportion des IdoA ainsi que le rapport IdoA(2S)/IdoA restent constants⁴⁹⁸. Les disaccharides IdoA(2S)-GlcNS(6S ou non) y sont les résidus les plus courants^{498, 499,500}. Bien que plus rares, des résidus GlcN non substitués (générés par la NDST-3 qui a une activité déacétylase 10 fois supérieure à son activité sulfotransférase) et des résidus GlcNS 3-O-sulfatés sont parfois observés dans les domaines NS et les domaines de transition N/S⁵⁰¹.

Les régions NS sont flanquées de zones de transition, les **domaines N/S**, qui représentent environ 20 à 25% d'une chaîne d'HS⁴⁹⁷. Ces zones sont constituées d'une alternance de disaccharides N-sulfatés et N-acétylés et contiennent des N- et des 6-O-sulfatations mais pas de 2-O-sulfatation, bien que des résidus IdoA soient présents dans ces régions.

D'une manière générale, les protéines se fixent aux domaines NS et N/S *via* des interactions principalement électrostatiques entre leurs régions basiques et les sulfates des HS. Pour certaines interactions protéines/HS, des séquences saccharidiques particulières ont été décrites : c'est le cas, par exemple, de l'interaction héparine/antithrombine III (AT-III), qui nécessite la présence d'un motif pentasaccharidique précis, afin d'entraîner le changement de conformation de la protéine (cf III-1.4.1.).

⁴⁹⁷ Gallagher, J. T. (2006) *Biochem Soc Trans* **34** (3), 438-441

⁴⁹⁸ Maccarana, M., Sakura, Y., Tawada, A., Yoshida, K. and Lindahl, U. (1996) *J Biol Chem* **271** (30), 17804-17810

⁴⁹⁹ Merry, C. L., Lyon, M., Deakin, J. A., Hopwood, J. J. and Gallagher, J. T. (1999) *J Biol Chem* **274** (26), 18455-18462

⁵⁰⁰ Safaiyan, F., Lindahl, U. and Salmivirta, M. (2000) *Biochemistry* **39** (35), 10823-10830

⁵⁰¹ Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (1998) *J Biol Chem* **273** (39), 24979-24982

L'ensemble de ces domaines NS et N/S est séparé par des régions non modifiées, les **domaines NA**, d'environ 15 disaccharides de long⁵⁰². Leur fonction reste mal connue ; ils pourraient servir à espacer les régions NS. Dans ce sens, un fragment d'HS présentant une forte affinité pour l'IFN γ a été décrit⁵⁰³. Ce fragment est constitué de deux courts domaines NS (hexa à octasaccharide) séparés par une région NA assez longue pour présenter les deux domaines NS aux sites de liaison protéiques situés sur chaque monomère d'IFN γ . Depuis, ce type d'organisation moléculaire a été décrit pour plusieurs interactions HS/protéines incluant le PDGF, l'IL-8, les chimiokines MIP et RANTES et l'endostatine^{504,505,506,507,508}.

La flexibilité des résidus IdoA, majoritairement présents au sein des domaines NS, renforce le rôle de ces domaines dans l'interaction avec différentes protéines. Contrairement aux GlcA qui restent stables, les IdoA oscillent en effet entre trois conformations « chaise », « bateau » et « bateau incliné », ces oscillations conférant une grande flexibilité à la chaîne polysaccharidique. L'abondance relative de chaque conformation dépend du degré de 2-O-sulfatation des résidus IdoA, du degré de sulfatation des glucosamines adjacentes et de la structure du ligand qui se fixe à l'oligosaccharide. Lors d'une interaction avec une protéine, l'équilibre entre les différentes formes est perturbé pour sélectionner la conformation la plus favorable. Cela a notamment été démontré pour l'interaction héparine/AT-III⁵⁰⁹ et HS/FGF-2⁵¹⁰. Dans le cas de la fixation à l'AT-III, l'IdoA2S du motif pentasaccharidique adopte la conformation « bateau incliné ». Il a été montré que le 2-O-sulfate du résidu IdoA2S n'est pas directement engagé dans la fixation de l'AT-III⁵¹¹ ; son rôle étant probablement d'affecter l'équilibre conformationnel du résidu, afin de créer une forte affinité entre le motif pentasaccharidique et l'AT-III.

Dans le cas de FGF-2, la protéine stabilise l'IdoA2S des motifs tétra- ou hexasaccharidiques dans la conformation « bateau ». Dans ce cas, l'IdoA est directement impliqué dans l'interaction avec FGF-2.

⁵⁰² Maccarana, M., Sakura, Y., Tawada, A., Yoshida, K. and Lindahl, U. (1996) *J Biol Chem* **271** (30), 17804-17810

⁵⁰³ Lortat-Jacob, H., Turnbull, J. E. and Grimaud, J. A. (1995) *Biochem J* **310** (2), 497-505

⁵⁰⁴ Stringer, S. E. and Gallagher, J. T. (1997) *J Biol Chem* **272** (33), 20508-20514

⁵⁰⁵ Spillmann, D., Witt, D. and Lindahl, U. (1998) *J Biol Chem* **273** (25), 15487-15493

⁵⁰⁶ Kreuger, J., Matsumoto, T., Vanwildemeersch, M., Sasaki, T., Timpl, R., Claesson-Welsh, L., Spillmann, D. and Lindahl, U. (2002) *Embo J* **21** (23), 6303-6311

⁵⁰⁷ Stringer, S. E., Forster, M. J., Mulloy, B., Bishop, C. R., Graham, G. J. and Gallagher, J. T. (2002) *Blood* **100** (5), 1543-1550

⁵⁰⁸ Vives, R. R., Sadir, R., Imberty, A., Rencurosi, A. and Lortat-Jacob, H. (2002) *Biochemistry* **41** (50), 14779-14789

⁵⁰⁹ Das, S. K., Mallet, J. M., Esnault, J., Driguez, P. A., Duchaussoy, P., Sizun, P., Herault, J. P., Herbert, J. M., Petitou, M. and Sinay, P. (2001) *Angew Chem Int Ed Engl* **40** (9), 1670-1673

⁵¹⁰ Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J. and Rees, D. C. (1996) *Science* **271** (5252), 1116-1120

⁵¹¹ Hricovini, M., Guerrini, M., Bisio, A., Torri, G., Naggi, A. and Casu, B. (2002) *Semin Thromb Hemost* **28** (4), 325-334

III-1.4. Propriétés fonctionnelles des HSPG

Les différentes modifications enzymatiques subies par les polysaccharides au cours de la biosynthèse génèrent une grande diversité structurale^{512,513}. Pour les chaînes d'HS/Hp, 48 disaccharides différents sont théoriquement possibles ; néanmoins, environ la moitié seulement a été observée dans la nature. En considérant que le site d'interaction d'une protéine sur une chaîne de GAG est approximativement de la longueur d'un hexasaccharide, le nombre de combinaisons d'hexasaccharides possibles à partir des 23 disaccharides connus est de l'ordre de 10000⁵¹⁴. Cette diversité permet aux HS d'interagir avec de nombreuses protéines. Bien que l'héparine soit couramment utilisée comme anticoagulant depuis plusieurs dizaines d'années, l'importance des HS en biologie n'a été reconnue que récemment.

Il est maintenant avéré que la liaison des chaînes saccharidiques sur des protéines ne résulte pas uniquement d'interactions électrostatiques entre les sulfates et les résidus protéiques basiques mais qu'elle engage des motifs saccharidiques plus ou moins spécifiques. L'exemple le plus connu est, en particulier, la séquence pentasaccharidique décrite pour la liaison à l'AT-III et qui confère à l'héparine ses propriétés anticoagulantes. L'analyse d'héparine commerciale a montré que seulement un tiers des chaînes possède la propriété de fixer l'AT-III, suggérant l'existence d'un motif saccharidique spécifique⁵¹⁵. Des analyses structurales ont, par la suite, décrit un pentasaccharide (figure 21), possédant des sulfatations particulières, essentielles à l'activité biologique : une 6-O-sulfatation sur la glucosamine du coté non réducteur et une 3-O-sulfatation sur la glucosamine interne⁵¹⁶.

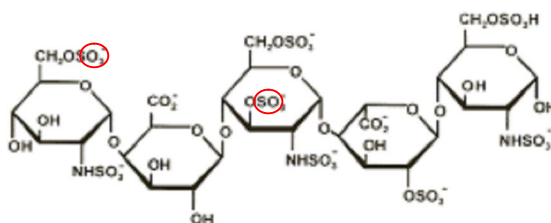


Figure 21 : motif de liaison à l'antithrombine III

Les groupements essentiels à l'interaction sont entourés en rouge.

III-1.4.1. Fonctions des chaînes d'HS

Les HSPG ne sont donc pas simplement des composants structuraux passifs des cellules, mais de véritables molécules multifonctionnelles qui contrôlent le comportement

⁵¹² Gallagher, J. T., Turnbull, J. E. and Lyon, M. (1992) *Int J Biochem* **24** (4), 553-560

⁵¹³ Salmivirta, M., Lidholt, K. and Lindahl, U. (1996) *Faseb J* **10** (11), 1270-1279

⁵¹⁴ Mulloy, B. and Rider, C. C. (2006) *Biochem Soc Trans* **34** (3), 409-413

⁵¹⁵ Lam, L. H., Silbert, J. E. and Rosenberg, R. D. (1976) *Biochem Biophys Res Commun* **69** (2), 570-577

⁵¹⁶ Kusche, M., Backstrom, G., Riesenfeld, J., Petitou, M., Choay, J. and Lindahl, U. (1988) *J Biol Chem* **263** (30), 15474-15484

d'une cellule en régulant finement les fonctions de nombreuses protéines. Ils interagissent avec des ligands de différentes façons.

Ils peuvent, par exemple, entraîner le **changement conformationnel d'une protéine** : c'est le cas de l'interaction héparine/AT-III ou **favoriser la liaison entre deux protéines** (AT-III/thrombine). Au cours de la réaction de coagulation, le facteur Xa et la thrombine sont activés et leur action conduit à la formation d'un caillot de sang. L'AT-III inhibe ces deux protéines. Seule, elle est faiblement neutralisante, mais en présence d'héparine, son pouvoir inhibiteur augmente 2000 fois. En effet, l'AT-III se fixe précisément sur le motif pentasaccharidique et cette interaction entraîne un changement de conformation de l'AT-III, suffisant pour neutraliser le facteur Xa⁵¹⁷. En revanche, l'inhibition de la thrombine par l'AT-III requiert des motifs saccharidiques plus longs (de 16 à 18 saccharides), qui contiennent à la fois le pentasaccharide et des sites adjacents de fixation à la thrombine^{518,519} (figure 22).

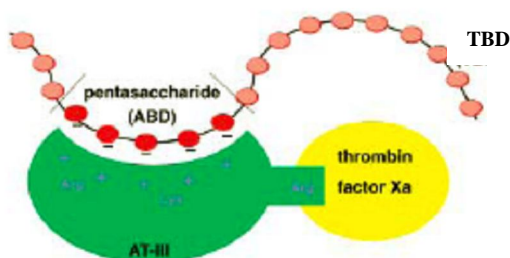


Figure 22 : représentation schématisée du complexe ternaire entre l'héparine, l'AT-III et les protéases à sérine⁵²⁰

Le motif pentasaccharidique (ou ABD pour *AT-III Binding Domain*) lie l'AT-III, permettant son changement conformationnel. Cette liaison AT-III/pentasaccharide est suffisante pour inhiber le facteur Xa. La neutralisation de la thrombine nécessite, en revanche, des oligosaccharides plus longs possédant l'ABD mais également des sites de fixation à la thrombine (ou TBD pour *Thrombin Binding Domain*).

Les HSPG peuvent également servir de **corécepteurs** et participer à la formation d'un complexe ternaire entre un ligand et son récepteur. Par exemple, les HS sont des éléments indispensables à l'interaction entre de nombreux facteurs de croissance (FGF, EGF...) et leurs récepteurs, ainsi qu'à l'activation de la voie de signalisation qui en découle. Les variations de structure des chaînes d'HS permettent aux cellules de moduler leur réponse en fonction du facteur de croissance fixé. En 1991, deux équipes ont démontré que les HS stabilisent la formation des complexes FGF-2/FGFR (récepteur de FGF) et participent à l'activation du

⁵¹⁷ Jin, L., Abrahams, J. P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R. N. and Carrell, R. W. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (26), 14683-14688

⁵¹⁸ Danielsson, A., Raub, E., Lindahl, U. and Bjork, I. (1986) *J Biol Chem* **261** (33), 15467-15473

⁵¹⁹ Hirsh, J., Warkentin, T. E., Shaughnessy, S. G., Anand, S. S., Halperin, J. L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E. M. and Dalen, J. E. (2001) *Chest* **119** (1), 64-94

⁵²⁰ Petitou, M. and Van Boeckel, C. A. (2004) *Angew Chem Int Ed Engl* **43** (24), 3118-3133

récepteur^{521,522}. Ils favorisent également l'oligomérisation de FGF⁵²³. Ce processus est réalisé *via* la formation d'un complexe ternaire FGF/FGFR/HS.

Deux modèles cristallographiques ont été proposés pour la structure de ce complexe^{524,525}. La structure de FGF-1 avec son récepteur et un oligosaccharide d'héparine⁵²⁴ révèle qu'une seule chaîne d'héparine fixe deux complexes FGF-1/FGFR-2 dans une stoechiométrie 2:2:1. En revanche, la structure de FGF-2 avec son récepteur et un oligosaccharide d'héparine⁵²⁵ suggère que deux chaînes d'HS seraient nécessaires pour fixer deux complexes FGF-2/FGFR-1, dans une stoechiométrie 2:2:2. Bien qu'à première vue éloignés l'un de l'autre, ces deux modèles néanmoins partagent des similitudes et confirment le concept du complexe ternaire⁵²⁶.

Les motifs des chaînes d'HS fixant les FGF sont constitués d'unités saccharidiques IdoA2S-GlcNS répétées 2 à 6 fois, le taux de fixation de FGF augmentant avec le nombre de répétitions^{527,528}. De façon générale, des tétra- ou des hexasaccharides sont suffisants pour fixer FGF avec une bonne affinité. Cependant, seuls des motifs de 8 à 12 saccharides permettent la formation d'un complexe ternaire FGF/FGFR/HS^{524,525,529}.

Les autres membres de la famille des FGF interagissent également avec les HS, au niveau de motifs de taille et de profil de sulfatation particuliers^{530,531,532}.

La fixation d'un HSPG sur une protéine peut la **protéger de la protéolyse** et augmenter son activité : c'est le cas de l'IFN γ , une cytokine sécrétée par les lymphocytes T et les cellules NK, qui se dimérise et intervient dans de nombreux processus biologiques tels que l'inflammation, la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire... La partie C-terminale de l'IFN γ , sensible à la protéolyse, possède deux domaines basiques. Le clivage de ces deux domaines diminue l'activité de la cytokine alors qu'un clivage du deuxième domaine uniquement augmente cette activité⁵³³. L'IFN γ se fixe aux HS avec une grande affinité, au niveau du premier domaine, limitant la protéolyse à la deuxième région et augmentant ainsi

⁵²¹ Rapraeger, A. C., Krufka, A. and Olwin, B. B. (1991) *Science* **252** (5013), 1705-1708

⁵²² Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P. and Ornitz, D. M. (1991) *Cell* **64** (4), 841-848

⁵²³ Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M. (1995) *Cell* **83** (3), 357-360

⁵²⁴ Pellegrini, L., Burke, D. F., von Delft, F., Mulloy, B. and Blundell, T. L. (2000) *Nature* **407** (6807), 1029-1034

⁵²⁵ Schlessinger, J., Plotnikov, A. N., Ibrahim, O. A., Eliseenkova, A. V., Yeh, B. K., Yayon, A., Linhardt, R. J. and Mohammadi, M. (2000) *Mol Cell* **6** (3), 743-750

⁵²⁶ Pellegrini, L. (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11** (5), 629-634

⁵²⁷ Jemth, P., Kreuger, J., Kusche-Gullberg, M., Sturiale, L., Gimenez-Gallego, G. and Lindahl, U. (2002) *J Biol Chem* **277** (34), 30567-30573

⁵²⁸ Maccarana, M., Casu, B. and Lindahl, U. (1993) *J Biol Chem* **268** (32), 23898-23905

⁵²⁹ Ostrovsky, O., Berman, B., Gallagher, J., Mulloy, B., Fernig, D. G., Delehedde, M. and Ron, D. (2002) *J Biol Chem* **277** (4), 2444-2453

⁵³⁰ Guimond, S. E. and Turnbull, J. E. (1999) *Curr Biol* **9** (22), 1343-1346

⁵³¹ Allen, B. L., Filla, M. S. and Rapraeger, A. C. (2001) *J Cell Biol* **155** (5), 845-858

⁵³² Allen, B. L. and Rapraeger, A. C. (2003) *J Cell Biol* **163** (3), 637-648

⁵³³ Dobeli, H., Gentz, R., Jucker, W., Garotta, G., Hartmann, D. and Hochuli, E. (1988) *J Biotechnol* **7**, 199-216

l'activité de la cytokine^{534,535}. La fixation de la chaîne d'HS sur l'IFN γ nécessite un motif saccharidique particulier : deux courts domaines NS, de 6 à 8 saccharides, reliés par une région NA⁵³⁶. Dans une telle structure, les domaines NS se fixent chacun à la partie C-terminale d'un monomère d'IFN γ . Des composés de synthèse mimant cette structure sont actuellement en cours d'étude au laboratoire⁵³⁷.

De la même façon, les HS interagissent avec SDF-1 α , une chimiokine impliquée, entre autre, dans la migration leucocytaire, la prolifération des cellules tumorales ou les étapes du développement⁵³⁸. Cette interaction protège la chimiokine d'une dégradation par la peptidase CD26 et maintient son activité⁵³⁹. La longueur optimale de la chaîne d'HS, dans ce cas, est de 12 saccharides.

Les HS participent parfois à **la concentration d'une protéine**, phénomène important dans le cas des chimiokines, par exemple lors d'une réaction inflammatoire. Dans ce cas, des chimiokines (RANTES, SDF-1 α , MCP-1...) sont sécrétées à partir du site d'inflammation, diffusent dans le système circulatoire et s'attachent aux HS présents à la surface des cellules. Il en résulte l'établissement d'un gradient chimiotactique qui va diriger les leucocytes vers le site inflammé^{540,541}.

Les HS peuvent, par ailleurs, induire **la dimérisation des chimiokines**. Par exemple, RANTES, chimiokine connue pour son activité dans l'inflammation et sa capacité à interférer dans l'infection par le VIH^{542,543}, est capable de s'oligomériser seule⁵⁴⁴ ou en présence d'HS⁵⁴⁵. Un modèle de l'oligomérisation de RANTES *via* les HS a été suggéré⁵⁴⁶. Il propose qu'une première molécule de RANTES se fixe à une chaîne d'HS, facilitant ainsi l'attachement d'une seconde molécule, à la fois sur l'oligosaccharide et sur la première chimiokine. La chaîne d'HS définie pour une interaction optimale varie entre 16 et 18 saccharides et, comme pour l'IFN γ , est constituée de deux domaines S séparés par une courte région non sulfatée, afin d'interagir simultanément avec les deux molécules de RANTES.

⁵³⁴ Lortat-Jacob, H. and Grimaud, J. A. (1991) *FEBS Lett* **280** (1), 152-154

⁵³⁵ Lortat-Jacob, H., Baltzer, F. and Grimaud, J. A. (1996) *J Biol Chem* **271** (27), 16139-16143

⁵³⁶ Lortat-Jacob, H., Turnbull, J. E. and Grimaud, J. A. (1995) *Biochem J* **310** (2), 497-505

⁵³⁷ Sarrazin, S., Bonnafant, D., Lubineau, A. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (45), 37558-37564

⁵³⁸ Sweeney, E. A., Lortat-Jacob, H., Priestley, G. V., Nakamoto, B. and Papayannopoulou, T. (2002) *Blood* **99** (1), 44-51

⁵³⁹ Sadr, R., Imbert, A., Baleux, F. and Lortat-Jacob, H. (2004) *J Biol Chem* **279** (42), 43854-43860

⁵⁴⁰ Rot, A. (1992) *Immunol Today* **13** (8), 291-294

⁵⁴¹ Gotte, M. (2003) *Faseb J* **17** (6), 575-591

⁵⁴² Appay, V., Brown, A., Cribbes, S., Randle, E. and Czaplewski, L. G. (1999) *J Biol Chem* **274** (39), 27505-27512

⁵⁴³ Appay, V. and Rowland-Jones, S. L. (2001) *Trends Immunol* **22** (2), 83-87

⁵⁴⁴ Czaplewski, L. G., McKeating, J., Craven, C. J., Higgins, L. D., Appay, V., Brown, A., Dudgeon, T., Howard, L. A., Meyers, T., Owen, J., Palan, S. R., Tan, P., Wilson, G., Woods, N. R., Heyworth, C. M., Lord, B. I., Brotherton, D., Christison, R., Craig, S., Cribbes, S., Edwards, R. M., Evans, S. J., Gilbert, R., Morgan, P., Randle, E., Schofield, N., Varley, P. G., Fisher, J., Waltho, J. P. and Hunter, M. G. (1999) *J Biol Chem* **274** (23), 16077-16084

⁵⁴⁵ Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A. and Wells, T. N. (1997) *Biochemistry* **36** (44), 13570-13578

⁵⁴⁶ Vives, R. R., Sadr, R., Imbert, A., Rencurosi, A. and Lortat-Jacob, H. (2002) *Biochemistry* **41** (50), 14779-14789

Enfin, les HS constituent d'éventuels **récepteurs d'attachement pour des pathogènes**, incluant des bactéries (*Borrelia burgdorferia*, *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp...*) et des virus (les AAV, les cytomégalovirus, le virus de la Dengue, le virus de la vaccine (VAC), le virus de l'herpès, le VIH...). Cette partie sera détaillée dans le chapitre III-2.

III-1.4.2. Fonctions du core protéique

Bien que les fonctions des HSPG dépendent principalement de leurs chaînes polysaccharidiques, il est maintenant avéré que les cores protéiques jouent également un rôle dans l'interaction avec certaines protéines. Par exemple, des études ont montré que le core protéique du syndécan-1 participe à la régulation de la cascade de signalisation induite par l'intégrine $\alpha V\beta 3$, responsable du contrôle de la prolifération dans le cancer du sein⁵⁴⁷. De même, le core protéique du betaglycan, le récepteur de TGF- β , dirige la fixation de TGF- β indépendamment de ses chaînes d'HS⁵⁴⁸. Parfois, la fonction des protéoglycanes peut également dépendre d'une coopération entre le core protéique et les chaînes d'HS qu'il porte. Cela a été montré pour le syndécan-1, pour lequel le core protéique et les HS sont nécessaires à l'inhibition de l'invasion du myélome dans les gels collagéniques⁵⁴⁹.

III-1.4.3. Rôle des enzymes de remodelage

Suite à leur biosynthèse, les HSPG sont sécrétés à la surface cellulaire ou dans la matrice extracellulaire. Une fois ancrés dans la membrane, ils peuvent subir des nouvelles modifications enzymatiques qui vont complètement les remodeler et changer leurs fonctions. Trois familles d'enzymes peuvent participer à ce mécanisme.

Les **métalloprotéinases**, en particulier les MMP-7 (*Matrix MetalloProteinase-7*), MT3-MMP et MT1-MMP, peuvent couper le syndécan-1 à la base de sa partie extracellulaire, en cas de stress ou de blessure, par exemple^{550,551}. Le protéoglycane solubilisé reste biologiquement actif, s'attache à la matrice extracellulaire ou entre dans le système circulatoire, augmentant alors le niveau de syndécan soluble dans les fluides biologiques^{552,553}. Ce phénomène réduit, d'une part, le nombre de « récepteurs cellulaires »,

⁵⁴⁷ Beauvais, D. M., Burbach, B. J. and Rapraeger, A. C. (2004) *J Cell Biol* **167** (1), 171-181

⁵⁴⁸ Andres, J. L., Stanley, K., Cheifetz, S. and Massague, J. (1989) *J Cell Biol* **109** (6), 3137-3145

⁵⁴⁹ Langford, J. K., Yang, Y., Kieber-Emmons, T. and Sanderson, R. D. (2005) *J Biol Chem* **280** (5), 3467-3473

⁵⁵⁰ Li, Q., Park, P. W., Wilson, C. L. and Parks, W. C. (2002) *Cell* **111** (5), 635-646

⁵⁵¹ Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M. and Sato, H. (2003) *J Biol Chem* **278** (42), 40764-40770

⁵⁵² Kainulainen, V., Wang, H., Schick, C. and Bernfield, M. (1998) *J Biol Chem* **273** (19), 11563-11569

⁵⁵³ Elenius, V., Gotte, M., Reizes, O., Elenius, K. and Bernfield, M. (2004) *J Biol Chem* **279** (40), 41928-41935

diminuant la transduction de signaux, et convertit, d'autre part, ces syndécans cellulaires en effecteurs solubles qui peuvent alors interagir de façon paracrine. Les fragments solubles peuvent avoir une fonction totalement opposée à celle qu'ils exerçaient, liés à la surface cellulaire. Par exemple, le syndécan-1 soluble inhibe la voie de signalisation de FGF-2⁵⁵⁴ alors que, fixé à la surface cellulaire, il l'active.

Les **héparanases** sont des endoglycosidases qui coupent les chaînes d'HS en fragments de 10 à 20 disaccharides. A l'intérieur des cellules, ces enzymes participent au catabolisme classique des HSPG, générant des fragments qui sont ensuite transportés dans les lysosomes pour être intégralement dégradés⁵⁵⁵. Lorsqu'elles sont sécrétées, les héparanases s'attaquent aux HSPG extracellulaires. Leur action permet de remodeler la surface de la cellule et la matrice, en réponse à une blessure ou une inflammation⁵⁵⁶. Elles participent également à la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaires en relarguant des facteurs de croissance initialement liés aux HSPG extracellulaires⁵⁵⁷. Les héparanases sont faiblement exprimées dans les tissus sains mais souvent produites dans les tumeurs, où elles augmentent les mécanismes d'invasion, d'angiogénèse et de métastase^{558,559}.

Les chaînes d'HS/HP peuvent également être modifiées par des **endosulfatases** extracellulaires : HSulf-1 et -2 et leur homologue Qsulf-1, observé chez la caille^{560,561}. Ces enzymes ôtent les 6-O-sulfates d'un certain nombre de disaccharides trisulfatés^{562,563}, éléments clés dans de nombreuses interactions protéines/HS. Ces enzymes jouent un rôle dans la régulation de l'embryogénèse^{560,564} et de nombreux cancers, présentant parfois une activité anti-angiogénique⁵⁶⁵ et parfois pro-angiogénique^{566,567}.

⁵⁵⁴ Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 729-777

⁵⁵⁵ Brauker, J. H. and Wang, J. L. (1987) *J Biol Chem* **262** (27), 13093-13101

⁵⁵⁶ Dempsey, L. A., Brunn, G. J. and Platt, J. L. (2000) *Trends Biochem Sci* **25** (8), 349-351

⁵⁵⁷ Ishai-Michaeli, R., Eldor, A. and Vlodavsky, I. (1990) *Cell Regul* **1** (11), 833-842

⁵⁵⁸ Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J. and Parish, C. R. (1999) *Nat Med* **5** (7), 803-809

⁵⁵⁹ Miao, H. Q., Elkin, M., Aingorn, E., Ishai-Michaeli, R., Stein, C. A. and Vlodavsky, I. (1999) *Int J Cancer* **83** (3), 424-431

⁵⁶⁰ Dhoot, G. K., Gustafsson, M. K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M. and Emerson, C. P., Jr. (2001) *Science* **293** (5535), 1663-1666

⁵⁶¹ Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S. and Rosen, S. D. (2002) *J Biol Chem* **277** (51), 49175-49185

⁵⁶² Ai, X., Do, A. T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and Emerson, C. P., Jr. (2003) *J Cell Biol* **162** (2), 341-351

⁵⁶³ Viviano, B. L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J. and Saunders, S. (2004) *J Biol Chem* **279** (7), 5604-5611

⁵⁶⁴ Ohto, T., Uchida, H., Yamazaki, H., Keino-Masu, K., Matsui, A. and Masu, M. (2002) *Genes Cells* **7** (2), 173-185

⁵⁶⁵ Lai, J. P., Chien, J. R., Moser, D. R., Staub, J. K., Aderca, I., Montoya, D. P., Matthews, T. A., Nagorney, D. M., Cunningham, J. M., Smith, D. I., Greene, E. L., Shridhar, V. and Roberts, L. R. (2004) *Gastroenterology* **126** (1), 231-248

⁵⁶⁶ Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S. and Rosen, S. D. (2002) *J Biol Chem* **277** (51), 49175-49185

⁵⁶⁷ Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Bistrup, A., Lum, D. H., Egeblad, M., Boudreau, N., Werb, Z. and Rosen, S. D. (2005) *Neoplasia* **7** (11), 1001-1010

III-1.4.4. Les motifs de reconnaissance des HS sur les protéines

Parallèlement à l'étude des motifs saccharidiques impliqués dans la fixation de protéines, des domaines de fixation à l'héparine ou HBD (pour *Heparin Binding Domains*) ont été identifiés pour un grand nombre de protéines. Deux séquences consensus principales, constituées de *clusters* d'acides aminés basiques, ont été définies : XBBXBX et XBBBXXBX ou B est un résidu basique et X un acide aminé hydrophobe ou neutre⁵⁶⁸. Ces motifs peuvent être linéaires, directement issus de la séquence primaire de la protéine, ou former un épitope conformationnel constitué d'acides aminés isolés qui se rapprochent lors du repliement de la protéine, ceci compliquant considérablement l'étude des HBD. Les arginines et les lysines (parfois les histidines) sont les résidus les plus fréquemment rencontrés dans ces domaines. Bien que ces deux acides aminés soient chargés positivement à pH physiologique, l'arginine fixerait l'héparine 2,5 fois plus fortement⁵⁶⁹. Les résidus non basiques jouent également un rôle dans les interactions protéines/héparine. Parmi eux, la sérine et la glycine sont généralement les plus décrits dans les HBD⁵⁷⁰. Ils possèdent de petites chaînes latérales, apportant le minimum de contraintes stériques et une bonne flexibilité pour que la protéine puisse se lier à l'héparine. Plusieurs approches ont été entreprises dans l'analyse des HBD : mutagenèse dirigée⁵⁷¹, caractérisation structurale de complexes héparine/protéines par cristallographie à rayons X⁵⁷², études RMN⁵⁷³ ou modélisation moléculaire⁵⁷⁴. La cristallographie apporte des informations structurales non négligeables sur les complexes héparine/protéines. Les structures de tels complexes ont été déterminées pour plusieurs protéines : l'AT-III, l'annexine V, différents FGF et leurs récepteurs, des enzymes de biosynthèse et des protéines de capsid virale^{572,575}. Les résidus protéiques engagés dans l'interaction avec l'héparine ont, de cette façon, pu être déterminés. Des études par RMN ont fourni des résultats similaires pour des facteurs de croissance⁵⁷⁶, l'apolipoprotéine E⁵⁷⁷, des molécules d'adhésion⁵⁷⁸ et des chimiokines⁵⁷⁹.

⁵⁶⁸ Cardin, A. D. and Weintraub, H. J. (1989) *Arteriosclerosis* **9** (1), 21-32

⁵⁶⁹ Fromm, J. R., Hileman, R. E., Caldwell, E. E., Weiler, J. M. and Linhardt, R. J. (1995) *Arch Biochem Biophys* **323** (2), 279-287

⁵⁷⁰ Caldwell, E. E., Nadkarni, V. D., Fromm, J. R., Linhardt, R. J. and Weiler, J. M. (1996) *Int J Biochem Cell Biol* **28** (2), 203-216

⁵⁷¹ Yamashita, H., Beck, K. and Kitagawa, Y. (2004) *J Mol Biol* **335** (5), 1145-1149

⁵⁷² Mulloy, B. and Linhardt, R. J. (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11** (5), 623-628

⁵⁷³ Kuschert, G. S., Hoogewerf, A. J., Proudfoot, A. E., Chung, C. W., Cooke, R. M., Hubbard, R. E., Wells, T. N. and Sanderson, P. N. (1998) *Biochemistry* **37** (32), 11193-11201

⁵⁷⁴ Lortat-Jacob, H., Grosdidier, A. and Imberty, A. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (3), 1229-1234

⁵⁷⁵ Imberty, A., Lortat-Jacob, H. and Perez, S. (2007) *Carbohydr Res* **342**, 430-439

⁵⁷⁶ Moy, F. J., Seddon, A. P., Bohlen, P. and Powers, R. (1996) *Biochemistry* **35** (42), 13552-13561

⁵⁷⁷ Dong, J., Peters-Libeu, C. A., Weisgraber, K. H., Segelke, B. W., Rupp, B., Capila, I., Hernaiz, M. J., LeBrun, L. A. and Linhardt, R. J. (2001) *Biochemistry* **40** (9), 2826-2834

⁵⁷⁸ Mikhailov, D., Young, H. C., Linhardt, R. J. and Mayo, K. H. (1999) *J Biol Chem* **274** (36), 25317-25329

⁵⁷⁹ Peterson, F. C., Elgin, E. S., Nelson, T. J., Zhang, F., Hoeger, T. J., Linhardt, R. J. and Volkman, B. F. (2004) *J Biol Chem* **279** (13), 12598-12604

III-1.5. Potentiel thérapeutique des molécules dérivées des HS

Depuis la découverte des propriétés anticoagulantes de l'héparine, un certain nombre d'approches visent le développement de thérapies basées sur l'utilisation de l'héparine ou des HS. Il existe un fort potentiel pour le développement de structures saccharidiques présentant des activités thérapeutiques, notamment dans le cas du cancer, des maladies inflammatoires et des infections virales⁵⁸⁰. En effet, de nombreuses protéines ont une fonction dépendante des HS ; l'idée est alors d'administrer des composés dérivés des HS afin de moduler l'activité de ces protéines.

III-1.5.1. L'héparine et ses dérivés comme agents anticoagulants

L'héparine fixe, *via* un motif pentasaccharidique particulier, l'AT-III, changeant alors sa conformation pour induire une meilleure neutralisation des protéases à sérine. Du fait de sa faible spécificité, l'héparine est, par ailleurs, capable de complexer le facteur plaquettaire 4 (PF-4) endogène et peut induire chez certains patients une réaction allergique qui se traduit par une chute brutale du nombre de plaquettes, connue sous le terme de thrombocytopénie. Cette chute résulte d'une activation plaquettaire par des complexes immuns, dont l'anticorps est dirigé contre l'héparine couplée au PF-4. Le complexe (Hp/PF-4/IgG) peut dérégler le processus de coagulation générant des thromboses artérielles ou veineuses⁵⁸¹. Des complications hémorragiques peuvent également survenir chez 5 % des patients⁵⁸⁰. Pour pallier ces effets néfastes, des approches alternatives ont été développées.

❖ L'héparine de faible masse moléculaire

Les molécules d'héparine de faible masse moléculaire ou *Low Molecular Weight Heparins* (LMWH) ont été développées par dégradation chimique et enzymatique de l'héparine d'intestin de porc, classiquement extraite et commercialisée. Contrairement à l'héparine entière, très hétérogène, les LMWH font de 4 à 6 kDa et sont plus homogènes⁵⁸². Ces LMWH catalysent l'inhibition du facteur Xa et, de façon moindre, de la thrombine. Elles possèdent un effet antithrombotique pratiquement identique à celui de l'héparine, mais, du fait de leur masse moléculaire plus faible, elles interagissent moins facilement avec d'autres constituants du sang, ce qui leur confère un profil pharmacocinétique plus favorable et une meilleure tolérance.

⁵⁸⁰ Lever, R. and Page, C. P. (2002) *Nat Rev Drug Discov* **1** (2), 140-148

⁵⁸¹ Amiral, J. and Meyer, D. (1998) *Baillieres Clin Haematol* **11** (2), 447-460

⁵⁸² Hoppensteadt, D., Walenga, J. M., Fareed, J. and Bick, R. L. (2003) *Hematol Oncol Clin North Am* **17** (1), 313-341

❖ L'héparine de synthèse

La deuxième approche concerne la synthèse chimique de structures dessinées pour se fixer spécifiquement à une protéine cible. Cette méthode, du fait de la diversité des HS, est un vrai challenge pour les chimistes. Les premières molécules synthétiques ont été produites il y a plus de 20 ans, dans le but d'étudier la fixation de l'héparine à l'AT-III^{583,584,585}. Ces travaux ont conduit à la production de la première structure d'héparine synthétique pour un usage clinique : le *Fondaparinux* (figure 23) (Arixtra, Sanofi-Synthelabo). Contrairement au motif pentasaccharidique de l'héparine, ce composé possède un groupement méthyl sur le cinquième saccharide, qui modifie les propriétés de cette extrémité réductrice en bloquant la réactivité du groupement aldéhyde⁵⁸⁶. Une telle molécule a l'avantage d'être moins réactive que l'héparine puisqu'elle ne se fixe pas au PF-4 et, ainsi, d'éliminer un certain nombre d'effets indésirables. De plus, son temps de demi-vie chez l'Homme est d'environ 17 heures et nécessite donc uniquement une seule administration journalière à la place des deux ou trois effectuées pour l'héparine, qui a un temps de demi-vie d'1 heure seulement.

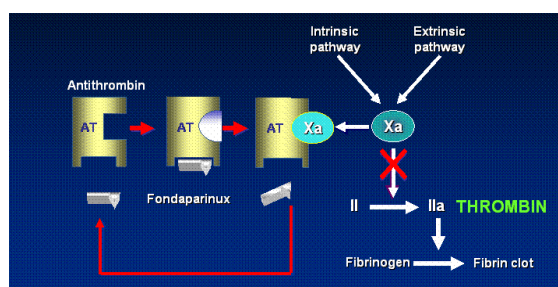


Figure 23 : mécanisme d'action du Fondaparinux⁵⁸⁷

Le Fondaparinux se fixe à AT-III, entraînant un changement conformationnel de l'AT-III. La fixation du Fondaparinux sur l'AT-III augmente considérablement son activité neutralisante vis-à-vis du facteur Xa. Une fois le facteur Xa neutralisé, le Fondaparinux est relargué pour agir sur une autre molécule d'AT-III.

D'autres analogues synthétiques du pentasaccharide d'héparine ont été développés pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques du Fondaparinux et sont actuellement en cours d'essais cliniques^{588,589}. Des essais cliniques de phase II sur l'Idraparinux ont

⁵⁸³ Choay, J., Petitou, M., Lormeau, J. C., Sinay, P., Casu, B. and Gatti, G. (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **116** (2), 492-499

⁵⁸⁴ Choay, J. (1985) *Semin Thromb Hemost* **11** (2), 81-85

⁵⁸⁵ Petitou, M., Duchaussoy, P., Lederman, I., Choay, J., Sinay, P., Jacquinet, J. C. and Torri, G. (1986) *Carbohydr Res* **147** (2), 221-236

⁵⁸⁶ Petitou, M. and Van Boeckel, C. A. (2004) *Angew Chem Int Ed Engl* **43** (24), 3118-3133

⁵⁸⁷ Turpie, A. G., Gallus, A. S. and Hoek, J. A. (2001) *N Engl J Med* **344** (9), 619-625

⁵⁸⁸ Herbert, J. M., Herault, J. P., Bernat, A., van Amsterdam, R. G., Lormeau, J. C., Petitou, M., van Boeckel, C., Hoffmann, P. and Meuleman, D. G. (1998) *Blood* **91** (11), 4197-4205

⁵⁸⁹ Bauer, K. A. (2003) *Chest* **124** (6 Suppl), 364S-370S

notamment montré qu'une injection hebdomadaire est suffisante. Il est actuellement en essais cliniques de phase III⁵⁹⁰.

Une deuxième génération de mimétiques d'héparine a été développée. Ces structures sont constituées de deux domaines fonctionnels séparés par un bras espaceur ou des disaccharides non sulfatés : le premier domaine fixe l'AT-III alors que le deuxième se lie à la thrombine^{591,592}. Des données cliniques sur un hexadécasaccharide de ce type indiquent qu'il est plus actif que l'héparine et qu'il ne se fixe pas au PF-4^{593,594}.

III-1.5.2. Les composés antitumoraux dérivés des HS

Les HS interviennent à plusieurs niveaux dans la régulation du processus de cancérisation : ils peuvent avoir des propriétés protumorales ou antitumorales selon leur localisation et les séquences saccharidiques qu'ils portent⁵⁹⁵. A la surface des cellules, ils fixent des facteurs de croissance impliqués dans différentes voies de signalisation et contrôlent ainsi la progression tumorale⁵⁹⁶. A la surface des cellules endothéliales avoisinant une région tumorale, ils se lient à des facteurs angiogéniques, tels que le VEGF ou le FGF-2, et induisent l'angiogénèse. Dans la matrice extracellulaire, ils contrôlent la croissance tumorale en séquestrant des facteurs de croissance et des facteurs angiogéniques mais aussi des facteurs anti-angiogéniques tels que l'endostatine⁵⁹⁷. Les HS régulent également le processus d'adhésion entre cellules, jouant ainsi un rôle majeur dans le contrôle des métastases. Enfin, dans la matrice extracellulaire, les HS, couplés à d'autres protéines de structure telles que le collagène et la laminine, créent une barrière physique contre les métastases. Les héparanases (cf III-1.4.3.), potentiellement sécrétées par les cellules tumorales, sont impliquées dans la dégradation de cette barrière et donc dans l'accélération des métastases^{598,599}.

De nombreuses études ont montré que l'héparine et, en particulier, les LMWH, affectent la formation des métastases (plutôt que la croissance de tumeurs primaires) *via* leur action anticoagulante, l'inhibition d'interaction entre cellules ou l'inhibition de l'invasion

⁵⁹⁰ Kubitz, D. and Haas, S. (2006) *Expert Opin Investig Drugs* **15** (8), 843-855

⁵⁹¹ Petitou, M., Herault, J. P., Bernat, A., Driguez, P. A., Duchaussoy, P., Lormeau, J. C. and Herbert, J. M. (1999) *Nature* **398** (6726), 417-422

⁵⁹² Petitou, M. and Van Boeckel, C. A. (2004) *Angew Chem Int Ed Engl* **43** (24), 3118-3133

⁵⁹³ Herbert, J. M., Herault, J. P., Bernat, A., Savi, P., Schaeffer, P., Driguez, P. A., Duchaussoy, P. and Petitou, M. (2001) *Thromb Haemost* **85** (5), 852-860

⁵⁹⁴ Herault, J. P., Cappelle, M., Bernat, A., Millet, L., Bono, F., Schaeffer, P. and Herbert, J. M. (2003) *J Thromb Haemost* **1** (9), 1959-1965

⁵⁹⁵ Liu, D., Shriver, Z., Venkataraman, G., El Shabrawi, Y. and Sasisekharan, R. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2), 568-573

⁵⁹⁶ Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G. and Narayanasami, U. (2002) *Nat Rev Cancer* **2** (7), 521-528

⁵⁹⁷ Blackhall, F. H., Merry, C. L., Lyon, M., Jayson, G. C., Folkman, J., Javaherian, K. and Gallagher, J. T. (2003) *Biochem J* **375** (1), 131-139

⁵⁹⁸ Vlodavsky, I. and Goldshmidt, O. (2001) *Haemostasis* **31**, 60-63

⁵⁹⁹ Sanderson, R. D., Yang, Y., Kelly, T., MacLeod, V., Dai, Y. and Theus, A. (2005) *J Cell Biochem* **96** (5), 897-905

cellulaire et de l'angiogénèse⁶⁰⁰. L'héparine réduit, en effet, les métastases dans des modèles animaux⁶⁰¹ et entraîne une amélioration dans certaines tumeurs malignes chez l'Homme^{602,603}. L'activité anti-métastatique de l'héparine semble due à sa capacité à inhiber l'héparanase. En effet, la présence des métastases dans les carcinomes se corrèle souvent avec l'expression de l'héparanase⁶⁰⁴. La coagulation peut également être associée à la progression tumorale. Les cellules tumorales expriment de forts taux de facteurs coagulants tels que la thrombine, qui conduisent à la formation d'un caillot de fibrine protégeant les cellules tumorales du système immunitaire. L'héparine abolit la formation de ce caillot, rendant alors la tumeur plus vulnérable. Les propriétés anticoagulantes de l'héparine limitent néanmoins son utilisation comme agent antitumoral.

De toutes ces observations est née l'idée que certains mimétiques de l'héparine pourraient être utilisés comme composés anticancéreux, afin, en particulier, d'inhiber l'héparanase et de réduire ses effets pathologiques^{605,606,607}. Des dérivés d'héparine chimiquement modifiés (afin de ne pas présenter d'action anticoagulante) ont été développés. L'héparine, traitée par une oxydation périodique puis une réduction au borohydrure, perd sa capacité à fixer l'AT-III et augmente son activité inhibitrice vis-à-vis de l'héparanase *in vitro*^{608,609}. Des oligosaccharides de différentes tailles ont été étudiés pour leurs propriétés antiangiogéniques. Des octasaccharides ont permis de réduire la densité du réseau vasculaire, sans présenter d'activité anticoagulante, suggérant qu'ils pourraient être de bons agents thérapeutiques. Leur mode d'action reste néanmoins incertain : s'il est convenu qu'ils agissent en entrant en compétition avec les HS endogènes pour fixer des facteurs de croissance, il n'a pas, à l'heure actuelle, été déterminé s'ils agissent également en inhibant l'héparanase⁶¹⁰.

⁶⁰⁰ Niers, T. M., Klerk, C. P., DiNisio, M., Van Noorden, C. J., Buller, H. R., Reitsma, P. H. and Richel, D. J. (2007) *Crit Rev Oncol Hematol* **61** (3), 195-207

⁶⁰¹ Sciumbata, T., Caretto, P., Pirovano, P., Pozzi, P., Cremonesi, P., Galimberti, G., Leoni, F. and Marcucci, F. (1996) *Invasion Metastasis* **16** (3), 132-143

⁶⁰² Hettiarachchi, R. J., Smorenburg, S. M., Ginsberg, J., Levine, M., Prins, M. H. and Buller, H. R. (1999) *Thromb Haemost* **82** (2), 947-952

⁶⁰³ Zacharski, L. R., Ornstein, D. L. and Mamourian, A. C. (2000) *Semin Thromb Hemost* **26**, 69-77

⁶⁰⁴ Engelberg, H. (1999) *Cancer* **85** (2), 257-272

⁶⁰⁵ Ferro, V., Li, C., Fewings, K., Palermo, M. C., Linhardt, R. J. and Toida, T. (2002) *Carbohydr Res* **337** (2), 139-146

⁶⁰⁶ Ma, P., Beck, S. L., Raab, R. W., McKown, R. L., Coffman, G. L., Utani, A., Chirico, W. J., Rapraeger, A. C. and Laurie, G. W. (2006) *J Cell Biol* **174** (7), 1097-1106

⁶⁰⁷ McKenzie, E. A. (2007) *Br J Pharmacol* **151** (1), 1-14

⁶⁰⁸ Casu, B., Guerrini, M., Naggi, A., Perez, M., Torri, G., Ribatti, D., Carminati, P., Giannini, G., Penco, S., Pisano, C., Belleri, M., Rusnati, M. and Presta, M. (2002) *Biochemistry* **41** (33), 10519-10528

⁶⁰⁹ Naggi, A., Casu, B., Perez, M., Torri, G., Cassinelli, G., Penco, S., Pisano, C., Giannini, G., Ishai-Michaeli, R. and Vlodavsky, I. (2005) *J Biol Chem* **280** (13), 12103-12113

⁶¹⁰ Hasan, J., Shnyder, S. D., Clamp, A. R., McGown, A. T., Bicknell, R., Presta, M., Bibby, M., Double, J., Craig, S., Leeming, D., Stevenson, K., Gallagher, J. T. and Jayson, G. C. (2005) *Clin Cancer Res* **11** (22), 8172-8179

D'autres polymères sulfatés tels que le laminarine sulfate (polysaccharide composé de β -1,3 glucane)⁶¹¹ ou la suramine^{612,613} ont montré une activité anti-héparanase et anti-métastatique au cours d'études précliniques sur des modèles animaux. L'utilisation de la suramine entraîne néanmoins des complications neurotoxiques. Des analogues moins toxiques ont été développés. Parmi eux, NF127, NF145 et NF171 inhibent l'héparanase deux fois plus puissamment que la suramine. Outre leur activité d'inhibition de l'héparanase, ces composés semblent également fixer des facteurs de croissance, bloquant leur interaction avec les récepteurs^{614,615,616}.

A l'heure actuelle, le seul composé en essais cliniques de phase II pour le traitement du cancer est le phosphosulfomannan (PI-88), isolé de la levure *pichia pastoris*⁶¹⁷. Il s'agit d'un mélange d'oligosaccharides fortement sulfatés (de 2 à 6 saccharides avec une majorité de pentasaccharides (60%) et de tétrasaccharides (30%)). Il inhibe l'héparanase et entre en compétition avec les HS pour la fixation aux facteurs de croissance pro-angiogéniques FGF-1, FGF-2 et VEGF^{618,619,620}. Des analogues possédant de meilleures propriétés pharmacocinétiques sont actuellement en développement⁶²¹.

Tous ces composés agissent en mimant les HS endogènes. Cependant, contrairement aux HS, la fixation aux facteurs de croissance n'induit pas leur activation et la fixation à l'héparanase bloque le site catalytique, inhibant alors la dégradation des HS endogènes.

III-1.5.3. Autres composés mimétiques des HS à potentiel thérapeutique

Outre leur utilisation en tant qu'agents anticoagulants ou antitumoraux, les dérivés des HS/Hp sont exploités dans différents domaines : parasitologie, maladies inflammatoires, virologie... L'héparine⁶²² et, plus récemment, l'héparine traitée au périodate et donc dépourvue de son activité anticoagulante⁶²³ permettent d'inhiber la fixation GAG-dépendante du parasite *Plasmodium falciparum* (responsable de la Malaria) à la surface des érythrocytes.

⁶¹¹ Miao, H. Q., Elkin, M., Aingorn, E., Ishai-Michaeli, R., Stein, C. A. and Vlodavsky, I. (1999) *Int J Cancer* **83** (3), 424-431

⁶¹² Myers, C., Cooper, M., Stein, C., LaRocca, R., Walther, M. M., Weiss, G., Choyke, P., Dawson, N., Steinberg, S., Uhrich, M. and et al. (1992) *J Clin Oncol* **10** (6), 881-889

⁶¹³ Stein, C. A. (1993) *Cancer Res* **53** (10), 2239-2248

⁶¹⁴ Pesenti, E., Sola, F., Mongelli, N., Grandi, M. and Spreafico, F. (1992) *Br J Cancer* **66** (2), 367-372

⁶¹⁵ Braddock, P. S., Hu, D. E., Fan, T. P., Stratford, I. J., Harris, A. L. and Bicknell, R. (1994) *Br J Cancer* **69** (5), 890-898

⁶¹⁶ Marchetti, D., Reiland, J., Erwin, B. and Roy, M. (2003) *Int J Cancer* **104** (2), 167-174

⁶¹⁷ Yu, G., Gunay, N. S., Linhardt, R. J., Toida, T., Fareed, J., Hoppensteadt, D. A., Shadid, H., Ferro, V., Li, C., Fewings, K., Palermo, M. C. and Podger, D. (2002) *Eur J Med Chem* **37** (10), 783-791

⁶¹⁸ Ferro, V., Li, C., Fewings, K., Palermo, M. C., Linhardt, R. J. and Toida, T. (2002) *Carbohydr Res* **337** (2), 139-146

⁶¹⁹ Cochran, S., Li, C., Fairweather, J. K., Kett, W. C., Coombe, D. R. and Ferro, V. (2003) *J Med Chem* **46** (21), 4601-4608

⁶²⁰ Coombe, D. R. and Kett, W. C. (2005) *Cell Mol Life Sci* **62** (4), 410-424

⁶²¹ Karoli, T., Liu, L., Fairweather, J. K., Hammond, E., Li, C. P., Cochran, S., Bergefall, K., Trybala, E., Addison, R. S. and Ferro, V. (2005) *J Med Chem* **48** (26), 8229-8236

⁶²² Munir, M., Tjandra, H., Rampengan, T. H., Mustadjab, I. and Wulur, F. H. (1980) *Paediatr Indones* **20**, 47-50

⁶²³ Vogt, A. M., Pettersson, F., Moll, K., Jonsson, C., Normark, J., Ribacke, U., Egwang, T. G., Ekre, H. P., Spillmann, D., Chen, Q. and Wahlgren, M. (2006) *PLoS Pathog* **2** (9), 100

Une étude récente⁶²⁴ propose que le PI-88 pourrait, de même, avoir un effet thérapeutique. L'héparine est également utilisée pour traiter divers désordres inflammatoires : asthme^{625,626}, arthrite rhumatoïde⁶²⁷, infarctus du myocarde⁶²⁸, rhinites allergiques⁶²⁹.

L'utilisation de dérivés des HS a donc un fort potentiel thérapeutique dans les traitements anti-inflammatoires. Des héparines dé-O-sulfatées (perte de l'activité anticoagulante), conservant leurs propriétés anti-inflammatoires, ont été développées⁶³⁰. Le pentosane polysulfate est utilisé comme anti-inflammatoire dans l'arthrose du genou⁶³¹.

De nombreux dérivés des HS ont, par ailleurs, montré leur efficacité dans la lutte antivirale. En effet, beaucoup de virus utilisent les HS de la surface cellulaire comme récepteur d'attachement. Des mimétiques d'HS solubles peuvent inhiber l'interaction des virus avec les HS endogènes empêchant l'adsorption puis l'entrée du virus dans la cellule. Cette partie sera détaillée dans le chapitre III-3.3.2.

Un même composé peut, par ailleurs, être exploité dans le traitement de pathologies très diverses. Le PI-88, par exemple, agent anticancéreux, est également connu pour ses activités anticoagulantes^{632,633} et antivirales contre le HSV⁶³⁴. De même, le pentosane polysulfate présente à la fois une activité anti-inflammatoire⁶³¹, antiangiogénique⁶³⁵, anticoagulante^{636,637} et antivirale^{638,639,640}.

La plupart des dérivés d'héparine sont issus soit de la synthèse chimique, soit extraits à partir de tissus bovins ou porcins. La synthèse chimique est une méthode longue et compliquée, nécessitant souvent plus de trente étapes (par exemple, plus de 50 étapes pour le pentasaccharide du Fondaparinux⁶⁴¹). La purification à partir de tissus animaux requiert également de nombreuses étapes et de gros volumes de solvants (20 tonnes pour purifier 1kg

⁶²⁴ Adams, T. E. and Huntington, J. A. (2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** (8), 1738-1745

⁶²⁵ Ahmed, T., Garrigo, J. and Danta, I. (1993) *N Engl J Med* **329** (2), 90-95

⁶²⁶ Diamant, Z., Timmers, M. C., van der Veen, H., Page, C. P., van der Meer, F. J. and Sterk, P. J. (1996) *Am J Respir Crit Care Med* **153** (6 Pt 1), 1790-1795

⁶²⁷ Gaffney, A. and Gaffney, P. (1996) *Br J Rheumatol* **35** (8), 808-809

⁶²⁸ Theroux, P., Waters, D., Qiu, S., McCans, J., de Guise, P. and Juneau, M. (1993) *Circulation* **88** (5), 2045-2048

⁶²⁹ Vancheri, C., Mastruzzo, C., Armato, F., Tomaselli, V., Magri, S., Pistorio, M. P., LaMicela, M., D'Amico, L. and Crimi, N. (2001) *J Allergy Clin Immunol* **108** (5), 703-708

⁶³⁰ Fryer, A., Huang, Y. C., Rao, G., Jacoby, D., Mancilla, E., Whorton, R., Piantadosi, C. A., Kennedy, T. and Hoidal, J. (1997) *J Pharmacol Exp Ther* **282** (1), 208-219

⁶³¹ Innes, J. F., Barr, A. R. and Sharif, M. (2000) *Vet Rec* **146** (15), 433-437

⁶³² Demir, M., Iqbal, O., Hoppensteadt, D. A., Piccolo, P., Ahmad, S., Schultz, C. L., Linhardt, R. J. and Fareed, J. (2001) *Clin Appl Thromb Hemost* **7** (2), 131-140

⁶³³ Piccolo, P., Iqbal, O., Demir, M., Ma, Q., Gerbutavicius, R. and Fareed, J. (2001) *Clin Appl Thromb Hemost* **7** (2), 149-152

⁶³⁴ Nyberg, K., Ekblad, M., Bergstrom, T., Freeman, C., Parish, C. R., Ferro, V. and Trybala, E. (2004) *Antiviral Res* **63** (1), 15-24

⁶³⁵ Zaslau, S., Sparks, S., Riggs, D., Jackson, B. and Kandzari, S. J. (2006) *Am J Surg* **192** (5), 640-643

⁶³⁶ Sie, P., Lansen, J., Lacheretz, F., Verschuere, B. and Boneu, B. (1986) *Thromb Haemost* **56** (3), 302-307

⁶³⁷ Liu, T., Scallan, C. D., Broze, G. J., Jr., Patarroyo-White, S., Pierce, G. F. and Johnson, K. W. (2006) *Thromb Haemost* **95** (1), 68-76

⁶³⁸ Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R. and de Clercq, E. (1988) *Antimicrob Agents Chemother* **32** (11), 1742-1745

⁶³⁹ Witvrouw, M. and De Clercq, E. (1997) *Gen Pharmacol* **29** (4), 497-511

⁶⁴⁰ Rusnati, M., Urbinati, C., Caputo, A., Possati, L., Lortat-Jacob, H., Giacca, M., Ribatti, D. and Presta, M. (2001) *J Biol Chem* **276** (25), 22420-22425

⁶⁴¹ Petitou, M. and Van Boeckel, C. A. (2004) *Angew Chem Int Ed Engl* **43** (24), 3118-3133

d'héparine). De plus, l'exploitation de produits animaux pose un vrai problème d'éthique et de sécurité sanitaire.

Pour pallier ces problèmes, des sources alternatives d'héparine sont étudiées. Un polysaccharide d'*Escherichia coli*, nommé K5, a été décrit comme structuralement identique au précurseur de l'héparine⁶⁴². Des modifications chimiques et/ou enzymatiques de K5 peuvent donc permettre de produire des composés mimétiques des HS, d'origine bactérienne, possédant des déterminants structuraux précis et maîtrisés^{643,644}. Ainsi, plusieurs molécules dérivées de K5, présentant des propriétés analogues à celles de l'héparine, ont montré une activité anticoagulante, antitumorale et/ou antivirale⁶⁴⁵.

III-2. Rôle des HS dans l'infection par des pathogènes

A la surface des cellules, les chaînes d'HS ont la capacité d'interagir avec de nombreux ligands extracellulaires. Parmi ceux-ci, des bactéries, des parasites et des virus exploitent les propriétés des chaînes d'HS pour s'adsorber à la surface de leurs cellules cibles (tableau VI). Cette étape d'attachement a souvent pour rôle de faciliter l'interaction ultérieure du pathogène avec des récepteurs cellulaires.

Bactéries	Parasites	Virus
Intracellulaires : <i>Borrelia burgdorferia</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Mycobacterium spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Extracellulaires: <i>Bordetella pertussis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Leishmania spp.</i> <i>Plasmodium spp.</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>	Adenovirus 2 et 5 Adeno-associated virus Cytomegalovirus Flavivirus (Dengue, Yellow fever, Hepatitis C) Foot-and-mouth disease virus Herpes simplex virus I et III Human immunodeficiency virus Papilloma virus Pseudorabies virus Respiratory syncytical virus Sindbis virus Vaccine virus

Tableau VI: exemples de pathogènes (bactéries, parasites, virus) utilisant les HS

Adapté de ^{646, 647, 648}

⁶⁴² Vann, W. F., Schmidt, M. A., Jann, B. and Jann, K. (1981) *Eur J Biochem* **116** (2), 359-364

⁶⁴³ Kusche, M., Hannesson, H. H. and Lindahl, U. (1991) *Biochem J* **275** (1), 151-158

⁶⁴⁴ Oreste and Zoppetti, 2002 brevet

⁶⁴⁵ Rusnati, M., Oreste, P., Zoppetti, G. and Presta, M. (2005) *Curr Pharm Des* **11** (19), 2489-2499

⁶⁴⁶ Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 729-777

⁶⁴⁷ Spillmann, D. (2001) *Biochimie* **83** (8), 811-817

⁶⁴⁸ Lortat-Jacob, H., Vives, R. R. and Fender, P. (2005) *Virologie* **9** (4), 315-325

III-2.1. Interaction HS – bactéries/parasites

Les HSPG affectent plusieurs processus centraux dans l'infection bactérienne et/ou parasitaire. A la surface cellulaire, ils participent à l'attachement puis à l'invasion des pathogènes. Libérés sous forme soluble, ils peuvent inhiber les défenses de l'hôte pour générer un environnement favorable à l'infection.

De nombreuses bactéries, telles que *Borrelia burgdorferia*, *Listeria monocytogenes* ou *Chlamydia trachomatis*, utilisent les HS comme sites d'ancrage sur la cellule^{649,650}. Le parasite *Plasmodium falciparum*, responsable de la Malaria, infecte également les hépatocytes et les érythrocytes de l'hôte *via* une adsorption préalable sur les HS cellulaires^{651,652,653}. Chez le moustique, ce parasite se fixe aux cellules des glandes salivaires, qui expriment des HS et des CS⁶⁵⁴. Cela suggère que le parasite utilise les HSPG, chez le moustique comme chez le mammifère, afin de se localiser au niveau des cellules cibles. Il est envisageable que d'autres pathogènes procèdent de la même façon. Par exemple, le virus de la Dengue infecte les cellules mammifères en interagissant avec les HS et est également transmis à l'Homme par le moustique. Ce virus pourrait donc utiliser les HS du moustique pour s'adsorber sur les cellules des glandes salivaires⁶⁵⁴.

D'autres bactéries exploitent, en revanche, les fragments de syndécans relargués par les métalloprotéinases pour augmenter leur virulence. C'est notamment le cas de *Pseudomonas aeruginosa*⁶⁵⁵. L'invasion de pathogènes active généralement des voies de signalisation impliquant des protéines à tyrosine kinase, des céramides, puis des MAP kinases^{656,657,658}, ces mêmes voies accélérant le relargage des syndécans⁶⁵⁹. En particulier, *P. aeruginosa* sécrète le facteur de virulence LasA, une protéase qui induit le relargage des syndécans *via* l'activation de la voie des protéines à tyrosine kinase⁶⁶⁰. Les fragments relargués peuvent également se lier à des peptides antimicrobiens riches en proline et en arginine et ainsi inhiber leur action. Les fragments solubles de syndécan participent, ici, à la

⁶⁴⁹ Rostand, K. S. and Esko, J. D. (1997) *Infect Immun* **65** (1), 1-8

⁶⁵⁰ Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 729-777

⁶⁵¹ Pinzon-Ortiz, C., Friedman, J., Esko, J. and Sinnis, P. (2001) *J Biol Chem* **276** (29), 26784-26791

⁶⁵² Vogt, A. M., Barragan, A., Chen, Q., Kironde, F., Spillmann, D. and Wahlgren, M. (2003) *Blood* **101** (6), 2405-2411

⁶⁵³ Vogt, A. M., Winter, G., Wahlgren, M. and Spillmann, D. (2004) *Biochem J* **381** (3), 593-597

⁶⁵⁴ Sinnis, P., Coppi, A., Tolda, T., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Xie, J., Kemp, M. M. and Linhardt, R. J. (2007) *J Biol Chem* **282** (35), 25376-25384

⁶⁵⁵ Park, P. W., Pier, G. B., Hinkes, M. T. and Bernfield, M. (2001) *Nature* **411** (6833), 98-102

⁶⁵⁶ Evans, D. J., Frank, D. W., Finck-Barbancon, V., Wu, C. and Fleiszig, S. M. (1998) *Infect Immun* **66** (4), 1453-1459

⁶⁵⁷ Finlay, B. B. and Falkow, S. (1989) *Microbiol Rev* **53** (2), 210-230

⁶⁵⁸ Tang, P., Sutherland, C. L., Gold, M. R. and Finlay, B. B. (1998) *Infect Immun* **66** (3), 1106-1112

⁶⁵⁹ Subramanian, S. V., Fitzgerald, M. L. and Bernfield, M. (1997) *J Biol Chem* **272** (23), 14713-14720

⁶⁶⁰ Park, P. W., Pier, G. B., Preston, M. J., Goldberger, O., Fitzgerald, M. L. and Bernfield, M. (2000) *J Biol Chem* **275** (5), 3057-3064

virulence de *P. aeruginosa*. Dans ce sens, des souris invalidées pour l'expression du syndécan-1 sont plus résistantes à l'infection par *P. aeruginosa* que des souris sauvages⁶⁶¹. De plus, le traitement des souris sauvages infectées par un inhibiteur du relargage des syndécans ou des HS solubles a des effets bénéfiques. *Staphylococcus aureus* est également impliqué dans le mécanisme de relargage des syndécans *via* deux facteurs de virulence, l' α -toxine et la β -toxine, qui vont permettre d'activer la voie cellulaire du relargage⁶⁶².

III-2.2. Interaction HS - virus

L'entrée d'un virus dans une cellule est une étape essentielle du cycle infectieux. Cette étape se divise en deux phases : interaction du virus avec un ou des récepteurs d'attachement, puis pénétration du matériel génétique viral dans la cellule infectée. Cette seconde étape repose également sur la reconnaissance de récepteurs cellulaires, dits corécepteurs.

Pour cela, les virus se sont adaptés à l'utilisation d'un grand nombre de molécules et, nombreux sont ceux qui utilisent les HSPG pour s'ancrer à la surface cellulaire^{663,664}. Cela concerne, par exemple (tableau VI), le virus de l'herpès (HSV), les cyomégalovirus (CMV) et le virus de la pseudorange, le VIH, le virus de la vaccine et différents poxvirus, des picornavirus comme le virus de la fièvre aphteuse (*foot-and-mouth disease virus*) ou des échovirus, des flavivirus (virus de la dengue, de la fièvre jaune, de l'hépatite C), des paramyxovirus, des alphavirus, certains adénovirus (Ad2, Ad5), les virus associés aux adénovirus (AAA), des papillomavirus⁶⁶⁵...

Dans la majorité des cas, les HSPG servent de récepteurs d'attachement au virus, facilitant son interaction ultérieure avec des récepteurs cellulaires. Dans certains cas, ils représentent néanmoins un déterminant critique de l'infection. Des travaux menés sur le virus de l'herpès⁶⁶⁶ et sur celui de la vaccine⁶⁶⁷ suggèrent notamment que la fusion membranaire peut dépendre des HSPG.

⁶⁶¹ Park, P. W., Pier, G. B., Preston, M. J., Goldberger, O., Fitzgerald, M. L. and Bernfield, M. (2000) *J Biol Chem* **275** (5), 3057-3064

⁶⁶² Park, P. W., Foster, T. J., Nishi, E., Duncan, S. J., Klagsbrun, M. and Chen, Y. (2004) *J Biol Chem* **279** (1), 251-258

⁶⁶³ Spillmann, D. (2001) *Biochimie* **83** (8), 811-817

⁶⁶⁴ Liu, J. and Thorp, S. C. (2002) *Med Res Rev* **22** (1), 1-25

⁶⁶⁵ Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., Zarski, J. P. and Drouet, E. (2002) *Virology* **292** (1), 162-168

⁶⁶⁶ Shieh, M. T. and Spear, P. G. (1994) *J Virol* **68** (2), 1224-1228

⁶⁶⁷ Hsiao, J. C., Chung, C. S. and Chang, W. (1998) *J Virol* **72** (10), 8374-8379

Trois situations ont été décrites :

- les HSPG fixent et concentrent le virus à la surface d'une cellule permissive ; ils favorisent ainsi l'interaction du virus avec un récepteur cellulaire. Ils jouent alors le rôle de récepteur d'attachement. C'est le cas de la majorité des virus⁶⁶⁸
- les HSPG de cellules non permissives capturent le virus à leur surface et le présentent, *en trans*, aux cellules cibles du virus. C'est notamment le cas du VIH⁶⁶⁹.
- Les HSPG sont directement impliqués dans les mécanismes d'entrée. C'est le cas rapporté pour le HSV-1⁶⁷⁰.

Tous ces travaux ont, néanmoins, été décrits pour des souches virales adaptées en laboratoire (souches TCLA pour *T-cell laboratory-adapted*), qui peuvent évoluer au contact des lignées cellulaires utilisées en laboratoire, souvent riches en HS, et sont, de ce fait, différentes des isolats primaires. Par exemple, des anticorps neutralisants sont efficaces contre des souches de VIH adaptées en laboratoire mais inactifs contre des isolats cliniques, suggérant que les phénomènes observés *in vitro* ne reflètent pas toujours les interactions *in vivo*^{671,672}. De la même façon, il est possible que les souches TCLA soient plus accessibles aux HSPG que les isolats primaires. Des travaux contradictoires quant aux interactions entre les HS cellulaires et des isolats primaires ont été publiés. Une étude a montré que, sur douze isolats primaires de VIH, seulement deux présentaient une nette préférence pour la présence d'HSPG à la surface des cellules cibles et a donc conclu que les HS ne représentaient pas des récepteurs majeurs dans l'attachement des virus *in vivo*⁶⁷³. En revanche, une autre équipe a montré que les isolats primaires (6 testés) interagissaient fortement avec les HSPG, suggérant un rôle physiologique important⁶⁶⁹. Enfin, certains virus (le virus de l'herpès équin et le virus de la fièvre aphteuse) ont développé la capacité d'interagir avec les HS, en culture⁶⁷⁴. Il apparaît donc nécessaire de souligner que les HSPG semblent jouer un rôle essentiel dans l'attachement de virus adaptés en laboratoire, mais, qu'en revanche, l'ampleur de leur rôle physiologique reste actuellement matière à controverse.

⁶⁶⁸ Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J. and Marks, R. M. (1997) *Nat Med* **3** (8), 866-871

⁶⁶⁹ Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2003) *Immunity* **18** (1), 27-39

⁶⁷⁰ Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D. and Spear, P. G. (1999) *Cell* **99** (1), 13-22

⁶⁷¹ Brand, D., Lemiale, F., Thibault, G., Verrier, B., Lebigoit, S., Roingeard, P., Buzelay, L., Brunet, S. and Barin, F. (2000) *Virology* **271** (2), 350-362

⁶⁷² York, J., Follis, K. E., Trahey, M., Nyambi, P. N., Zolla-Pazner, S. and Nunberg, J. H. (2001) *J Virol* **75** (6), 2741-2752

⁶⁷³ Zhang, Y. J., Hatzioannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S. P. and Bieniasz, P. D. (2002) *J Virol* **76** (12), 6332-6343

⁶⁷⁴ Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A. and Mason, P. W. (1997) *J Virol* **71** (7), 5115-5123

Les premiers travaux menés sur les interactions virus / HS datent de plus de 15 ans et concernent les mécanismes d'infection du HSV⁶⁷⁵. Le HSV-1 est un virus enveloppé à la surface duquel se trouvent au moins quatre glycoprotéines impliquées dans les mécanismes d'attachement et d'entrée : les protéines gB, gC, gD et gH-gL⁶⁷⁶. L'attachement du virus à la surface cellulaire implique les HS ainsi que gB et gC⁶⁷⁷. La protéine gD est, en revanche, directement impliquée dans l'entrée virale *via* une interaction avec différents récepteurs d'entrée : les nectin-1 et nectin-2 (deux membres de la famille des immunoglobulines), le HVEM (appartenant à la famille des récepteurs TNF) ou des HS présentant des motifs structuraux particuliers. L'interaction gD/HS entraîne, en effet, l'entrée du virus en activant la fusion des membranes virales et cellulaires.

Des études ont permis de définir les 2-O-sulfatations et les 6-O-sulfatations nécessaires à l'interaction des HS avec gB et gC^{678,679}. Au niveau protéique, un site de liaison aux HS a été défini pour gB⁶⁸⁰ et au moins trois séquences consensus pour gC⁶⁸¹. La structure oligosaccharidique reconnue par gD a également été étudiée⁶⁸². Il s'agit d'un oligosaccharide qui contient un motif particulier : une glucosamine 3-O-sulfatée liée à un acide iduronique 2-O-sulfaté.

Les 3-O-sulfotransférases (HS3ST) semblent ainsi être des enzymes essentielles dans la définition de motifs de liaison aux protéines. C'est, en effet, une 3-O-sulfatation spécifique, générée par la HS3ST-1, qui est à l'origine du motif pentasaccharidique de liaison à l'ATIII. Dans le cas de l'HSV, c'est l'HS3ST-3 (formes A et B) qui définit la structure particulière se liant à gD. Ces deux isoformes ont des substrats différents, d'où la mise en place de motifs singuliers (figure 24). En revanche, les HS3ST-5 et -6 semblent capables de générer les deux motifs de fixation à l'ATIII et à gD^{682,683}. Récemment, la participation des HS3ST-2 et -6 dans l'entrée du HSV-1 a également été décrite⁶⁸⁴.

⁶⁷⁵ WuDunn, D. and Spear, P. G. (1989) *J Virol* **63** (1), 52-58

⁶⁷⁶ Spear, P. G. and Longnecker, R. (2003) *J Virol* **77** (19), 10179-10185

⁶⁷⁷ Shukla, D. and Spear, P. G. (2001) *J Clin Invest* **108** (4), 503-510

⁶⁷⁸ Feyzi, E., Trybala, E., Bergstrom, T., Lindahl, U. and Spillmann, D. (1997) *J Biol Chem* **272** (40), 24850-24857

⁶⁷⁹ Trybala, E., Liljeqvist, J. A., Svennerholm, B. and Bergstrom, T. (2000) *J Virol* **74** (19), 9106-9114

⁶⁸⁰ Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D. B., Zucchini, S., Manservigi, R. and Glorioso, J. C. (1998) *J Virol* **72** (7), 6119-6130

⁶⁸¹ Trybala, E., Bergstrom, T., Svennerholm, B., Jeansson, S., Glorioso, J. C. and Olofsson, S. (1994) *J Gen Virol* **75** (4), 743-752

⁶⁸² Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D. and Spear, P. G. (1999) *Cell* **99** (1), 13-22

⁶⁸³ Tiwari, V., Clement, C., Duncan, M. B., Chen, J., Liu, J. and Shukla, D. (2004) *J Gen Virol* **85** (4), 805-809

⁶⁸⁴ O'Donnell, C. D., Tiwari, V., Oh, M. J. and Shukla, D. (2006) *Virology* **346** (2), 452-459

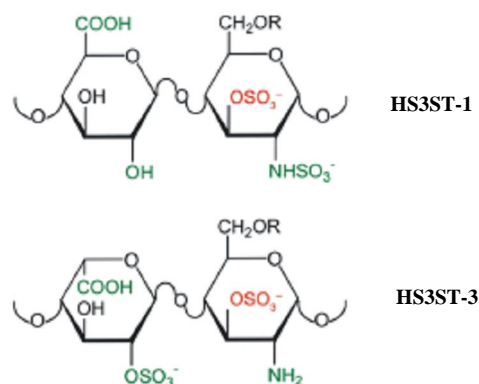


Figure 24 : déterminants structuraux des disaccharides reconnus par les HS3ST-1 et -3⁶⁸⁵

La spécificité de substrat de chaque isoforme implique probablement plus de deux résidus dans l'oligosaccharide. Néanmoins, les groupes représentés en vert sur la figure contribuent potentiellement à la reconnaissance par une enzyme ou l'autre. Les groupements sulfate ajoutés par chaque enzyme sont représentés en rouge. Le disaccharide modifié par l'HS3ST-1 fait partie du pentasaccharide de liaison à l'ATIII alors que celui modifié par l'HS3ST-3 fait partie du motif de reconnaissance de la protéine gD.

Ainsi, dans le cas du HSV, l'infection d'une cellule peut être favorisée par les HS, qui interviennent dans l'attachement du virus à la surface cellulaire puis dans la fusion des membranes. L'expression d'HS sur les cellules cibles n'est cependant pas une condition *sine qua non* à l'infection puisque certaines protéines peuvent servir de récepteurs d'entrée pour l'HSV. Néanmoins, même dans ces conditions, la présence d'HSPG augmente notablement la fixation et l'entrée virale^{686,687}.

III-3. Rôle des HS dans l'infection par le VIH

De nombreux travaux rapportent que le VIH exploite également les propriétés fixatrices des HS pour s'adsorber à la surface des cellules hôtes⁶⁸⁸. Cette interaction fait intervenir la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et pourrait avoir un rôle dans les premières étapes du processus d'infection virale.

III-3.1. Interaction des HS avec la protéine gp120 du VIH

Des études ont montré que l'interaction VIH/HS dépend de la quantité et du degré de sulfatation des HS présents à la surface cellulaire⁶⁸⁹. La plupart des travaux sur le sujet ont été conduits avec des lignées cellulaires exprimant de larges quantités d'HS alors que les cellules

⁶⁸⁵ Shukla, D. and Spear, P. G. (2001) *J Clin Invest* **108** (4), 503-510

⁶⁸⁶ Gruenheid, S., Gatzke, L., Meadows, H. and Tufaro, F. (1993) *J Virol* **67** (1), 93-100

⁶⁸⁷ Banfield, B. W., Leduc, Y., Esford, L., Visalli, R. J., Brandt, C. R. and Tufaro, F. (1995) *Virology* **208** (2), 531-539

⁶⁸⁸ Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. and Norcross, M. A. (1995) *J Virol* **69** (4), 2233-2239

⁶⁸⁹ Ohshiro, Y., Murakami, T., Matsuda, K., Nishioka, K., Yoshida, K. and Yamamoto, N. (1996) *Microbiol Immunol* **40** (11), 827-835

cibles pour la réplication du VIH expriment généralement des quantités bien plus modestes. Une étude a, en particulier, ciblé le taux d'expression des HSPG et du récepteur CD4 à la surface des lymphocytes T et des macrophages⁶⁹⁰. Les lymphocytes T possèdent une faible quantité d'HS, qui varie en fonction de l'état de maturation du lymphocyte, et expriment fortement CD4. Les monocytes expriment peu de CD4 et peu d'HS. En revanche, les macrophages possèdent peu de récepteurs CD4 et beaucoup d'HS, ce qui signifie que la différenciation monocytes/macrophages induit, entre autre, l'expression d'HSPG. Enfin, une autre étude a montré que les cellules endothéliales et épithéliales, non permissives pour la réplication (CD4-), sont recouvertes d'un nombre élevé d'HS⁶⁹¹. De plus, *in vivo*, la quantité et la structure de ces chaînes oligosaccharidiques dépendent de nombreux facteurs, comme l'origine tissulaire des cellules, leur état d'activation ou de différenciation^{692,693}. Une étude récente a visé la caractérisation des motifs saccharidiques impliqués dans l'interaction avec gp120 : il semble que les groupements 6-O-sulfate jouent un rôle crucial dans la fixation du VIH aux HSPG des cellules épithéliales⁶⁹⁴.

Ainsi, l'importance physiologique des HS dans l'entrée et la réplication du VIH varie probablement en fonction du type cellulaire rencontré.

III-3.1.1. Rôle des HS dans l'entrée virale

Deux populations virales principales ont été définies en fonction du tropisme viral qu'elles présentent. Les souches R5, majoritaires en début d'infection, infectent préférentiellement les macrophages et utilisent le corécepteur CCR5 pour infecter les cellules. En revanche, les souches X4 utilisent CXCR4 et infectent classiquement les lymphocytes T. Il existe également des souches R5X4 qui utilisent indifféremment les deux corécepteurs (cf I-2.3.2.). Ces populations varient majoritairement de par la charge globale de la boucle V3 de leur protéine gp120 : la boucle V3 des souches X4 et R5X4 est très basique (charge nette de +7 à +10) alors que celles des isolats R5 l'est moins (charge globale inférieure à +5). Par ailleurs, les souches X4 adaptées en laboratoire (TCLA) ont une boucle V3 extrêmement basique (+9 pour la souche HXBc2) : elle est généralement plus basique que celle des isolats primaires X4⁶⁹⁵.

⁶⁹⁰ Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2001) *J Virol* **75** (19), 9187-9200

⁶⁹¹ Yanagishita, M. and Hascall, V. C. (1992) *J Biol Chem* **267** (14), 9451-9454

⁶⁹² Maccarana, M., Sakura, Y., Tawada, A., Yoshida, K. and Lindahl, U. (1996) *J Biol Chem* **271** (30), 17804-17810

⁶⁹³ Salmivirta, M., Safaiyan, F., Prydz, K., Andresen, M. S., Aryan, M. and Kolset, S. O. (1998) *Glycobiology* **8** (10), 1029-1036

⁶⁹⁴ Bobardt, M. D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B. and Gallay, P. A. (2007) *J Virol* **81** (1), 395-405

⁶⁹⁵ Fouchier, R. A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F. and Schuitemaker, H. (1992) *J Virol* **66** (5), 3183-3187

Une étude a montré que la capacité de gp120 à interagir avec les HS était associée à la charge de la boucle V3⁶⁹⁶. En effet, Les protéines gp120 issues d'isolats viraux de type X4 fixent le polysaccharide de façon notable, ce qui n'est pas le cas de l'enveloppe des virus R5. Cette différence s'observe également au niveau du virus entier, comme le démontrent des analyses d'interaction utilisant la résonance plasmonique de surface (figure 25). Il est important de noter que les virus X4 forment des complexes extrêmement stables avec le polysaccharide (dissociation virtuellement inexistante). Ceci s'explique probablement par la présence de multiples sites de fixation sur un virus entier et suggère que les HS permettent un ancrage particulièrement efficace à la surface des cellules.

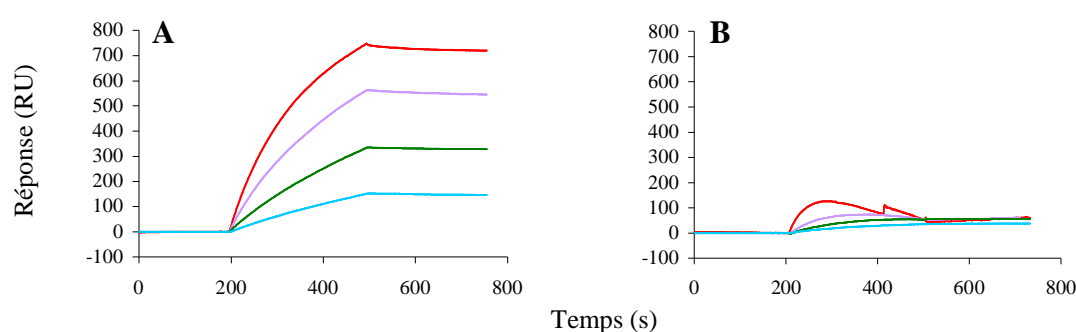


Figure 25 : adsorption de virus de tropisme viral différent sur une surface d'héparine⁶⁹⁷

Mesures d'interaction de virus de type X4 (A) ou R5 (B) sur une surface d'héparine. Les différents sensorgrammes correspondent à des injections de 6.25, 12.5, 25 et 50 µg/ml (de bas en haut), après soustraction des contrôles négatifs (lysats cellulaires non infectés, injectés aux mêmes concentrations).

Une telle sélectivité s'explique par une divergence de séquence de la boucle V3 des protéines gp120 de ces deux types d'isolats viraux. En effet, la boucle V3 très basique d'une souche X4 comporte plus de résidus susceptibles d'interagir avec les HS que la boucle V3 des virus R5 est moins basique⁶⁹⁶. De plus, la boucle V3 de certains isolats X4 possède un motif XBBBXXBX, similaire aux séquences consensus décrites dans d'autres analyses d'interaction héparine/protéines⁶⁹⁸.

Plusieurs études sont venues confirmer l'importance de la charge de la boucle V3 dans la fixation aux HS. En particulier, une étude a montré que la présence d'HS à la surface des cellules favorise l'infection par les virus X4, mais n'a que peu d'effet, ou même inhibe, l'infection par les virus R5⁶⁹⁹. En effet, les souches R5 semblent infecter avec une plus grande efficacité les cellules dépourvues d'HS. Des virus X4, modifiés avec une boucle V3 de type

⁶⁹⁶ Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) *J Virol* **74** (4), 1948-1960

⁶⁹⁷ Lortat-Jacob, H., Vives, R. R. and Fender, P. (2005) *Virologie* **9** (4), 315-325

⁶⁹⁸ Flynn, S. J. and Ryan, P. (1995) *J Virol* **69** (2), 834-839

⁶⁹⁹ Zhang, Y. J., Hatziloannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S. P. and Bieniasz, P. D. (2002) *J Virol* **76** (12), 6332-6343

R5, deviennent, comme les souches R5, plus infectieux vis-à-vis des cellules qui n'expriment pas d'HS, confirmant l'importance de la boucle V3 dans l'interaction avec les polysaccharides. Cette étude a alors suggéré que les HS créent une barrière électrostatique à la surface cellulaire, inhibant l'infection par les virus R5, dont la boucle V3 est moins basique. Dans ce sens, un traitement préalable des cellules avec des polycations, tels que le Polybrène connu pour augmenter le pouvoir infectieux de divers rétrovirus en neutralisant ou en réversant les charges négatives à la surface des cellules cibles⁷⁰⁰, permet d'augmenter le taux d'infection par des isolats R5.

In vivo, ces différences d'affinité pour les HS pourraient expliquer les différences physiologiques notables existant entre les isolats X4 et R5. Cependant, l'importance du rôle des HS *in vivo* est à modérer puisque les lymphocytes T, les cibles prédominantes du VIH, expriment une faible quantité d'HS et un traitement à l'héparinase de ces lymphocytes primaires n'altère que peu l'infection par une souche X4 ou R5⁷⁰¹. Néanmoins, il reste certain que les HS jouent différents rôles dans la biologie du VIH *in vitro* et qu'ils sont susceptibles d'intervenir dans l'infection par le VIH *in vivo*. Les premières analyses de l'interaction VIH/HS⁷⁰² laissaient penser que les HS augmentent l'infectivité uniquement en favorisant la concentration des virus à la surface cellulaire. Depuis, des études plus récentes ont suggéré que le rôle des HS dans l'infection virale va bien au-delà de celui d'un récepteur de faible spécificité.

❖ Les HS permettent l'infection des macrophages

Une équipe de recherche⁷⁰³ a comparé l'attachement du virus sur les macrophages et sur les lymphocytes T. Ces travaux ont montré que les HS sont capables de compenser le faible taux de molécules CD4 exprimées par les macrophages, lors de l'adsorption du virus à la surface cellulaire. Il faut néanmoins noter que le clivage des chaînes d'HS à la surface des cellules et le blocage simultané de CD4 n'inhibent pas complètement l'attachement du VIH sur les macrophages, suggérant que d'autres récepteurs macrophagiques, tels que le récepteur à mannose ou DC-SIGN (cf II-2.3.) interviennent dans ce processus. Le modèle proposé, dans ce cas, est le suivant : les HSPG permettraient de concentrer les virus à la surface des macrophages pour faciliter leur interaction avec les récepteurs CD4, faiblement exprimés. Néanmoins, l'efficacité de ce processus demeure incertain puisqu'il est probable que

⁷⁰⁰ Palsson, B. and Andreadis, S. (1997) *Exp Hematol* **25** (2), 94-102

⁷⁰¹ Ibrahim, J., Griffin, P., Coombe, D. R., Rider, C. C. and James, W. (1999) *Virus Res* **60** (2), 159-169

⁷⁰² Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. and Norcross, M. A. (1995) *J Virol* **69** (4), 2233-2239

⁷⁰³ Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2001) *J Virol* **75** (19), 9187-9200

beaucoup de ces virus ne vont jamais rencontrer de CD4 et seront, dans ce cas, endocytosés dans les macrophages pour être détruits⁷⁰⁴.

❖ *Les HS capturent et protègent le virus à la surface de cellules CD4-*

Par la suite, d'autres études⁷⁰⁵ ont établi que les cellules endothéliales et épithéliales, riches en HS et non permissives pour la réplication, pouvaient capturer des quantités considérables de VIH à leur surface et préserver le pouvoir infectieux du virus pendant plus de six jours. Les mécanismes de cette protection sont encore indéfinis : certains ont proposé un scénario proche de celui de DC-SIGN (cf I-3.1.1.) dans lequel les syndécans permettraient l'internalisation du virus afin de le protéger d'un environnement extracellulaire hostile⁷⁰⁶. Les chaînes anioniques des HSPG pourraient également avoir un simple effet protecteur sur le VIH, en repoussant ou en neutralisant les protéases.

❖ *Les HS participent à l'infection en trans des lymphocytes T*

Les travaux de Bobardt *et al.* ont également permis de mettre en évidence un nouveau rôle des HS : à la surface des cellules non permissives, ils auraient la capacité de capturer les virus puis de les transmettre aux cellules permissives pour la réplication, notamment aux lymphocytes T (figure 26). Ce mécanisme pourrait expliquer l'importante transmission virale dans les ganglions lymphatiques (principaux sites de réplication virale) : il est possible que les HSPG situés à la surface des cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux approvisionnant ces ganglions capturent et empêchent, dans ce cas, la diffusion du VIH, puis infectent *en trans* les lymphocytes T transitant, *via* ces vaisseaux, vers les organes lymphoïdes, où de nouvelles particules virales sont produites⁷⁰⁵. Néanmoins, comme pour les analyses réalisées sur des macrophages, l'élimination totale des HS à la surface de l'endothélium n'inhibe pas complètement l'adsorption du virus, laissant penser que d'autres récepteurs d'attachement (par exemple, les lectines) participent également à l'attachement du virus sur les cellules endothéliales.

Il se peut également que les HS forment des « ponts » entre les cellules endothéliales et les lymphocytes T, favorisant les contacts entre les virus adsorbés sur les cellules endothéliales et les lymphocytes T. Dans ce sens, des études ont montré que les HSPG possèdent la capacité de fixer la L-sélectine, une lectine abondamment exprimée à la surface des lymphocytes T^{707,708}.

⁷⁰⁴ Marechal, V., Prevost, M. C., Petit, C., Perret, E., Heard, J. M. and Schwartz, O. (2001) *J Virol* **75** (22), 11166-11177

⁷⁰⁵ Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. and Galloway, P. A. (2003) *Immunity* **18** (1), 27-39

⁷⁰⁶ Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duynhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G. and van Kooyk, Y. (2000) *Cell* **100** (5), 587-597

⁷⁰⁷ Norgard-Sumnicht, K. and Varki, A. (1995) *J Biol Chem* **270** (20), 12012-12024

⁷⁰⁸ Giuffrè, L., Cordey, A. S., Monai, N., Tardy, Y., Schapira, M. and Spertini, O. (1997) *J Cell Biol* **136** (4), 945-956

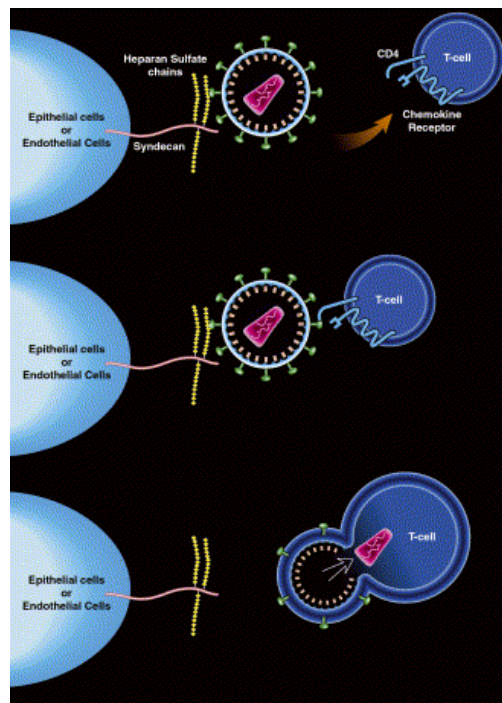


Figure 26 : rôles des héparanes sulfate dans l'infection *en trans* de cellules⁷⁰⁹

Les cellules endothéliales ou épithéliales, non permissives pour la réplication virale, sont capables de fixer le VIH à leur surface par l'intermédiaire des chaînes d'HS puis de le relarguer à proximité de lymphocytes T, qui expriment les récepteurs nécessaires à leur infection.

❖ *Les HS participent à la transcytose du VIH à travers les cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales ne sont pas permissives pour la réplication du VIH mais effectuent une transcytose du virus de leur pôle apical vers leur partie basale, d'où les virus bourgeonnent pour aller infecter des macrophages ou des lymphocytes T.

Plusieurs travaux ont montré l'implication des HS dans le phénomène de transcytose. Récemment, deux équipes^{710,711} ont suggéré que les HS (et les chondroïtines sulfate) des cellules endothéliales du cerveau étaient impliqués dans le passage du virus à travers la barrière hématoencéphalique. Les premiers ont postulé que les protéoglycanes facilitaient l'entrée du virus dans les cellules alors que les seconds ont suggéré un rôle dans l'adsorption initiale du virus à la surface des cellules endothéliales. Dans ce cas, les HS jouent le rôle de véritable « porte d'entrée », favorisant l'invasion virale du système nerveux.

Une autre équipe a récemment montré l'importance des HS dans le passage du VIH à travers les cellules endothéliales des muqueuses génitales⁷¹². L'élimination des HS à la surface de ces cellules diminue de 60% l'attachement des virus.

⁷⁰⁹ Gallay, P. (2004) *Microbes Infect* **6** (6), 617-622

⁷¹⁰ Argyris, E. G., Acheampong, E., Nunnari, G., Mukhtar, M., Williams, K. J. and Pomerantz, R. J. (2003) *J Virol* **77** (22), 12140-12151

⁷¹¹ Bobardt, M. D., Salmon, P., Wang, L., Esko, J. D., Gabuzda, D., Fiala, M., Trono, D., Van der Schueren, B., David, G. and Gallay, P. A. (2004) *J Virol* **78** (12), 6567-6584

⁷¹² Saidi, H., Magri, G., Nasreddine, N., Requena, M. and Belec, L. (2007) *Virology* **358** (1), 55-68

❖ *La différence d'affinité des souches X4 et R5 pour les HS peut expliquer la propagation des isolats R5 en début d'infection*

Lors d'une contamination par le VIH, bien que la source de contamination (sang, sperme...) contienne des isolats X4 et R5, on observe une propagation préférentielle des souches R5. Les virus X4, beaucoup plus virulents, apparaissent plus tard, induisant une forte déplétion des lymphocytes T et l'apparition de la phase de SIDA (cf I-2.3.2.).

La distribution des HS à la surface des cellules ainsi que leur capacité à interagir, avec une plus grande affinité, avec les isolats de tropisme X4 pourraient fournir un début d'explication à la prédominance des souches R5 au début de l'infection. Plusieurs équipes ont, en effet, suggéré que les HS pourraient stocker les virus de type X4 à la surface des cellules, en particulier les cellules épithéliales qui sont parmi les premières rencontrées par le VIH, et, ainsi, favoriser l'infection par les souches R5^{713,714,715,716}. En particulier, Saïdi *et al.* ont montré que les HS situés au pôle apical des cellules épithéliales permettaient l'attachement des virus de tropisme X4 comme R5 (avec néanmoins une meilleure affinité pour les souches X4) mais, qu'en revanche, les HS de la partie basolatérale fixaient préférentiellement les isolats X4.

De ce fait, les virus s'attachent puis sont transcytosés à travers les cellules épithéliales quel que soit leur tropisme. Lorsque ces mêmes virus bourgeonnent à partir de la partie basolatérale, les HS séquestrent une partie des souches X4. Cette même étude a, de plus, montré que la fixation des virus R5 sur les cellules endothéliales, contrairement à l'attachement des souches X4, induit la production de chimiokines qui vont attirer les monocytes/macrophages, facilitant ainsi la dissémination des isolats de type R5 (ces virus infectent préférentiellement les macrophages). Ces deux éléments (séquestration des virus X4 par les HS et attraction des macrophages) fournissent une explication potentielle à l'émergence des virus R5 au début de l'infection. Néanmoins, elle doit être nuancée, puisque plusieurs travaux ont montré que les virus séquestrés *via* les HS, à la surface des cellules épithéliales, restent infectieux plusieurs jours et peuvent être relargués à proximité de cellules permissives pour la réplication. Dans ce cas, il est alors possible que les virus X4 attachés à la partie basolatérale soient protégés quelques jours puis relargués, dans certaines conditions qu'il reste à déterminer.

⁷¹³ Ugolini, S., Mondor, I., Parren, P. W., Burton, D. R., Tilley, S. A., Klasse, P. J. and Sattentau, Q. J. (1997) *J Exp Med* **186** (8), 1287-1298

⁷¹⁴ Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) *J Virol* **74** (4), 1948-1960

⁷¹⁵ Zhang, Y. J., Hatzioannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S. P. and Bieniasz, P. D. (2002) *J Virol* **76** (12), 6332-6343

⁷¹⁶ Saïdi, H., Magri, G., Nasreddine, N., Requena, M. and Belec, L. (2007) *Virology* **358** (1), 55-68

Ainsi, la prédominance des souches R5 reste, à ce jour, inexplicée mais les HS pourraient induire leur propagation préférentielle, en stockant uniquement les isolats X4.

Ces données illustrent les rôles multiples que pourraient jouer les HS, à la surface des cellules, dans le mécanisme d'entrée virale, dans la ségrégation des souches virales, dans le passage de la barrière hématoencéphalique, dans le « stockage » des virus ou dans les mécanismes d'infection *en trans*.

III-3.1.2. Caractérisation des sites d'interaction gp120/HS

La protéine gp120 joue un rôle dans l'attachement et dans l'entrée du VIH dans les cellules, interagissant, dans un premier temps, avec CD4⁷¹⁷ puis, au niveau de son épitope CD4i, avec CCR5 et CXCR4, des corécepteurs de la famille des récepteurs à chimiokines⁷¹⁸ (cf II-2.). Par ailleurs, gp120 peut également interagir avec les HS. Deux sites de fixation aux HS ont été caractérisés au niveau de gp120 : la boucle V3 et le site CD4i.

L'interaction HS / **boucle V3** a notamment été démontrée au cours d'expériences préliminaires de destruction des HS à l'aide de différentes enzymes⁷¹⁹. Le niveau d'adsorption du virus à la surface des cellules, ainsi que l'infectivité, sont nettement diminués lorsque ces cellules sont privées d'une partie ou de tous les HS. Cela a permis de déterminer que l'adsorption du VIH à la surface des cellules est réalisée par des interactions entre la boucle V3 de gp120 et les groupements sulfate des HS cellulaires. Des études sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre la boucle V3 pour bloquer l'interaction gp120 / HS ont validé l'importance de la boucle V3⁷²⁰. Néanmoins, les résidus impliqués dans cette interaction ne sont pas encore connus. Des données de modélisation moléculaire ont suggéré que les résidus Arg304, Arg306, Arg308 et Arg327 de la souche TCLA HXBc2 étaient susceptibles d'interagir avec les HS⁷²¹. Récemment, un résidu basique à la base de la boucle V3 d'une souche R5 (Arg298) a été décrit comme critique pour la fixation aux HS^{722,723}.

⁷¹⁷ Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. and Montagnier, L. (1984) *Nature* **312** (5996), 767-768

⁷¹⁸ Berger, E. A., Murphy, P. M. and Farber, J. M. (1999) *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700

⁷¹⁹ Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. and Norcross, M. A. (1995) *J Virol* **69** (4), 2233-2239

⁷²⁰ Harrop, H. A., Coombe, D. R. and Rider, C. C. (1994) *Aids* **8** (2), 183-192

⁷²¹ Vives, R. R., Imbert, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (22), 21353-21357

⁷²² de Parseval, A., Bobardt, M. D., Chatterji, A., Chatterji, U., Elder, J. H., David, G., Zolla-Pazner, S., Farzan, M., Lee, T. H. and Gallay, P. A. (2005) *J Biol Chem* **280** (47), 39493-39504

⁷²³ Bobardt, M. D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B. and Gallay, P. A. (2007) *J Virol* **81** (1), 395-405

Récemment, un deuxième site d'interaction avec les HS a été décrit : il s'agit de l'épitope CD4i, domaine de fixation aux corécepteurs^{724,725}. En utilisant différents anticorps monoclonaux anti-gp120, il a été possible d'inhiber partiellement l'interaction avec l'héparine, notamment grâce aux anticorps dirigés contre le domaine CD4i ; ceci suggérant que le polysaccharide se fixe à gp120 au niveau de cet épitope⁷²⁴. De fait, en préincubant des molécules de gp120 avec une forme recombinante soluble de CD4 (sCD4) qui a pour effet d'exposer l'épitope CD4i, il a été montré que l'affinité de gp120 pour l'héparine était fortement accrue⁷²⁵ ; ceci confirmant l'importance du domaine CD4i dans l'interaction avec les HS (figure 27).

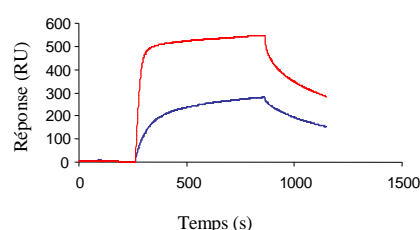


Figure 27 : analyse de l'interaction héparine/gp120 par le système BIAcore

gp120 (15 nM) préincubée (rouge) ou non (bleu) avec 80 nM de sCD4 est injectée sur une surface d'héparine. Les résultats sont exprimés en RU (unités de résonance) en fonction du temps. La fixation de CD4 sur gp120 augmente l'interaction gp120/héparine, suggérant que cette interaction est réalisée, en partie, *via* le site CD4i.

La présence de deux sites d'interaction a également été suggérée par des approches de modélisation moléculaire, réalisée à partir des données cristallographiques obtenues sur le core protéique de gp120, tronquée de ses parties N- et C-terminales et de ses boucles hypervariables⁷²⁶. La boucle V3 qui manquait dans la structure de Kwong a été modélisée à partir de données de RMN⁷²⁷ et de cristallographie⁷²⁸, puis replacée sur le core protéique⁷²⁵. La modélisation de gp120, colorée en fonction du potentiel électrostatique, définit un *cluster* d'acides aminés basiques (figure 28-en rouge) comme site possible d'interaction avec les HS. Il s'agit de l'épitope CD4i. Le criblage *in silico* d'une banque conformationnelle d'oligosaccharides d'héparine, réalisée à partir de la structure de l'héparine⁷²⁹ a ensuite permis de sélectionner un certain nombre de fragments dont la composition s'adapte au mieux aux sites d'interactions modélisés.

⁷²⁴ Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) *J Virol* **74** (4), 1948-1960

⁷²⁵ Vives, R. R., Imberty, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (22), 21353-21357

⁷²⁶ Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

⁷²⁷ Sharon, M., Kessler, N., Levy, R., Zolla-Pazner, S., Gorlach, M. and Anglister, J. (2003) *Structure* **11** (2), 225-236

⁷²⁸ Stanfield, R. L., Gorny, M. K., Williams, C., Zolla-Pazner, S. and Wilson, I. A. (2004) *Structure (Camb)* **12** (2), 193-204

⁷²⁹ Mulloy, B., Forster, M. J., Jones, C. and Davies, D. B. (1993) *Biochem J* **293** (3), 849-858

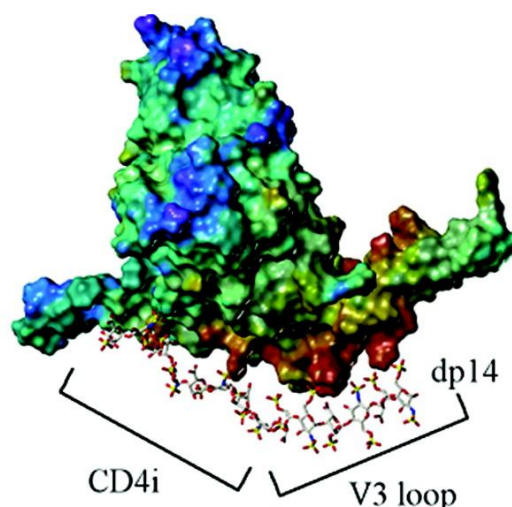


Figure 28 : étude de l'interaction héparine/gp120 par modélisation moléculaire⁷³⁰

Modélisation du complexe formé par une molécule de gp120 de type X4 en interaction avec un tétradecasaccharide (dp14) d'héparine choisi pour s'adapter au mieux aux sites d'interaction définis par les résidus basiques de CD4i et la modélisation de la boucle V3.

Enfin, des travaux ont montré que les anticorps 17b et 48d (spécifiques de l'épitope CD4i), greffés sur une surface BIAcore, sont capables de lier gp120 en présence de sCD4 et que cette interaction (figure 29) est inhibée très efficacement (IC_{50} # quelques nM) par des molécules d'héparine.

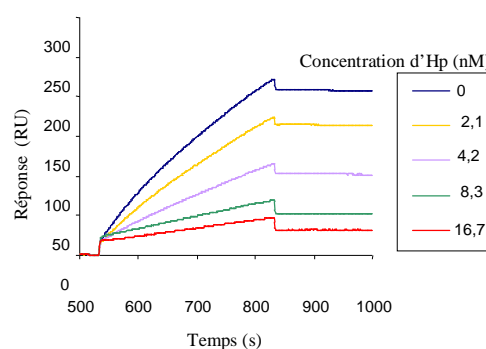


Figure 29 : inhibition de l'interaction gp120/CD4/17b par l'héparine⁷³⁰

gp120 (5 nM) en présence de sCD4 (10 nM) et de 0 à 16,7 nM d'Hp est injectée sur une surface BIAcore fonctionnalisée avec un anticorps anti-CD4i (17b). En absence d'héparine, le complexe gp120/CD4 se fixe sur la surface de façon maximale. L'héparine permet d'inhiber l'interaction gp120/CD4/17b, probablement en se liant à CD4i. Cette inhibition est dose-dépendante.

Ainsi, l'épitope CD4i constitue non seulement un site de fixation pour les corécepteurs mais aussi pour les HS. Des calculs de potentiel électrostatique ont permis de montrer que la boucle V3, lorsqu'elle présente une forte charge positive (virus X4 et R5X4), contribue de

⁷³⁰ Vives, R. R., Imberty, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (22), 21353-21357

façon majoritaire au potentiel électrostatique de gp120 et pourrait se lier aux HS cellulaires, enfin d'attirer gp120 à proximité des récepteurs cellulaires. Une interaction entre le site CD4i et les HS pourrait ultérieurement avoir lieu. En revanche, pour des boucles V3 moins chargées (virus R5), le core protéique de gp120 contribue de façon plus significative au potentiel électrostatique de gp120⁷³¹. Dans cette situation, gp120 interagirait avec CD4 sans fixation préalable *via* les HS. L'épitope CD4i formé, fortement conservé entre les souches X4 et R5, pourrait, ensuite, interagir avec les HS. Cela expliquerait que les HS puissent inhiber la fixation de gp120 aux corécepteurs, que la souche soit de type X4 ou R5.

De ce fait, le site CD4i pourrait être ciblé de façon efficace par des molécules dérivées des HS, dans le but d'inhiber l'entrée du virus, quel que soit son tropisme, dans les cellules.

III-3.2. Interaction des HS avec la protéine Tat du VIH

Les HS, outre leur fixation à gp120, sont également capables de fixer la protéine Tat (*Transactivating factor*) du VIH.

Tat est polypeptide cationique de 86 à 101 résidus qui, une fois relargué dans le milieu extracellulaire, peut pénétrer dans les cellules infectées de façon latente pour stimuler l'activité transcriptionnelle des LTR du VIH⁷³². Par ailleurs, la protéine Tat, dans le milieu extracellulaire, stimule l'expression des corécepteurs, augmentant la permissivité des cellules pour l'infection par le VIH⁷³³. Enfin, Tat induit également des effets biologiques sur les cellules non permissives pour la réplication et est impliqué dans de nombreuses pathologies associées au VIH^{734,735,736}.

Tat interagit avec quatre classes de récepteurs à la surface des cellules cibles : des récepteurs d'adhésion de la famille des intégrines⁷³⁷, des récepteurs de VEGF⁷³⁸, les récepteurs à chimiokines CCR2, CCR3 et CXCR4^{739,740} et les HSPG qui, en fixant Tat, augmentent sa concentration locale et participent à son internalisation, son activité de transactivation et ses autres effets pathologiques⁷⁴¹.

⁷³¹ Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (2000) *J Virol* **74** (4), 1961-1972

⁷³² Mann, D. A. and Frankel, A. D. (1991) *Embo J* **10** (7), 1733-1739

⁷³³ Secchiero, P., Zella, D., Capitani, S., Gallo, R. C. and Zauli, G. (1999) *J Immunol* **162** (4), 2427-2431

⁷³⁴ Corallini, A., Altavilla, G., Pozzi, L., Bignozzi, F., Negrini, M., Rimessi, P., Gualandi, F. and Barbanti-Brodano, G. (1993) *Cancer Res* **53** (22), 5569-5575

⁷³⁵ Dewhurst, S., Gelbard, H. A. and Fine, S. M. (1996) *Mol Med Today* **2** (1), 16-23

⁷³⁶ Noonan, D. and Albin, A. (2000) *Adv Pharmacol* **48**, 229-250

⁷³⁷ Urbinati, C., Mitola, S., Tanghetti, E., Kumar, C., Waltenberger, J., Ribatti, D., Presta, M. and Rusnati, M. (2005) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25** (11), 2315-2320

⁷³⁸ Albin, A., Benelli, R., Presta, M., Rusnati, M., Ziche, M., Rubartelli, A., Pagliarunga, G., Bussolino, F. and Noonan, D. (1996) *Oncogene* **12** (2), 289-297

⁷³⁹ Albin, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M. G., Proudfoot, A. E., Alouani, S., Wells, T. N., Mariani, G., Rabin, R. L., Farber, J. M. and Noonan, D. M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (22), 13153-13158

⁷⁴⁰ Xiao, H., Neuveut, C., Tiffany, H. L., Benkirane, M., Rich, E. A., Murphy, P. M. and Jeang, K. T. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (21), 11466-11471

⁷⁴¹ Rusnati, M. and Presta, M. (2002) *Angiogenesis* **5** (3), 141-151

Tat se fixe aux HS et à l'héparine *via* son domaine C-terminal basique, riche en arginines et lysines fortement conservées parmi différents isolats^{742,743,744}.

III-3.3. Intérêt thérapeutique de molécules dérivées des HS dans l'infection VIH

III-3.3.1. Données physiologiques

❖ HS solubles

In vivo, les HSPG de la surface cellulaire peuvent être relargués par l'action d'enzymes particulières (cf III-1.4.3.). Ce processus fait partie du renouvellement normal des HSPG⁷⁴⁵. De ce fait, de nombreux fragments d'HSPG, qui ont conservé leurs propriétés fixatrices, se retrouvent sous forme soluble dans la matrice extracellulaire et peuvent entrer en compétition avec leurs homologues cellulaires pour la fixation de certains ligands. De la même façon, on pourrait imaginer que des HSPG solubles, développés dans un but thérapeutique, bloquent l'attachement du virus à la surface cellulaire⁷⁴⁶.

❖ HSPG et chimiokines

In vivo, les chimiokines SDF-1 α et RANTES, ligands naturels des corécepteurs CXCR4 et CCR5, ont la propriété de bloquer l'infection du VIH par différents mécanismes, principalement par gêne stérique et en provoquant l'endocytose du récepteur^{747,748}. Sur cette base, un certain nombre de chimiokines modifiées ont déjà été développées.

Par ailleurs, les chimiokines ont également la capacité de se fixer aux HSPG présents à la surface cellulaire⁷⁴⁹. Une étude a montré l'importance des HSPG dans l'inhibition de l'entrée virale par la chimiokine SDF-1 α ⁷⁵⁰. Cette équipe a proposé que l'attachement de SDF-1 α aux HSPG augmente la concentration locale en chimiokines au niveau de CXCR4, facilitant ainsi l'occupation du récepteur par SDF-1 α et donc l'inhibition de l'interaction

⁷⁴² Goldstein, G. (1996) *Nat Med* **2** (9), 960-964

⁷⁴³ Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albin, A., Noonan, D., d'Adda di Fagagna, F., Giacca, M. and Presta, M. (1997) *J Biol Chem* **272** (17), 11313-11320

⁷⁴⁴ Rusnati, M., Tulipano, G., Urbinati, C., Tanghetti, E., Giuliani, R., Giacca, M., Ciomei, M., Corallini, A. and Presta, M. (1998) *J Biol Chem* **273** (26), 16027-16037

⁷⁴⁵ Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 729-777

⁷⁴⁶ Gallay, P. (2004) *Microbes Infect* **6** (6), 617-622

⁷⁴⁷ Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. and Lusso, P. (1995) *Science* **270** (5243), 1811-1815

⁷⁴⁸ Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. and Springer, T. A. (1996) *Nature* **382** (6594), 829-833

⁷⁴⁹ Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J. L., Delepiepierre, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H. and Arenzana-Seisdedos, F. (1999) *J Biol Chem* **274** (34), 23916-23925

⁷⁵⁰ Valenzuela-Fernandez, A., Palanche, T., Amara, A., Magerus, A., Altmeyer, R., Delaunay, T., Virelizier, J. L., Baleux, F., Galzi, J. L. and Arenzana-Seisdedos, F. (2001) *J Biol Chem* **276** (28), 26550-26558

VIH/CXCR4. Le même modèle a été proposé concernant le rôle de RANTES dans l'inhibition de l'infection par des souches R5^{751,752,753}.

❖ Rôle des sulfatations dans l'infection VIH

Les corécepteurs utilisés par le VIH, et en particulier CCR5, présentent un certain nombre de tyrosines sulfatées, dans leur partie N-terminale (cf II-2.2.4.). Ces résidus sulfatés jouent un rôle essentiel dans la fusion du VIH avec la cellule cible⁷⁵⁴, ce qui suggère que le site CD4i requiert, entre autre, la présence de sulfates pour interagir avec CCR5.

De même, de nombreux anticorps neutralisants, dirigés contre l'épitope CD4i, possèdent, au niveau de leur région CDR3 (*complementarity-determining region 3*), plusieurs tyrosines sulfatées, cruciales dans la fixation à gp120 et la neutralisation de l'infection^{755,756}. Des peptides tyrosine-sulfatés dérivés de ces anticorps, possèdent également la propriété de neutraliser l'infection⁷⁵⁷.

Enfin, contrairement à l'héparine, de l'héparine 6-O-désulfatée (2-O et 3-O sulfatations intactes) n'inhibe plus la fixation du VIH ni aux HSPG à la surface des cellules, ni à CCR5⁷⁵⁸. Ceci suggère que les motifs 6-O sulfatés des HSPG miment les tyrosines sulfatées de la partie N-terminale de CCR5. De la même façon, des peptides sulfatés de CCR5 et des anticorps possédant des tyrosines sulfatées, dirigés contre le site CD4i, inhibent la fixation de gp120 aux HSPG. Ainsi, ces anticorps, ces peptides, les corécepteurs CCR5 et les HSPG présentent un mode de fixation à gp120 similaire, *via* leurs motifs sulfatés. De récentes études structurales⁷⁵⁹ suggèrent que les régions sulfatées de CCR5 et d'un anticorps anti-CD4i présentent globalement des conformations différentes, mais qu'une tyrosine sulfatée critique induit, dans les deux cas, des réarrangements structuraux de gp120 similaires.

Ces données suggèrent qu'une stratégie basée sur l'interaction de CD4i avec une molécule dérivée des HS pourrait empêcher la fixation du virus sur les corécepteurs. La difficulté, dans ce cas, serait de cibler le site CD4i, habituellement masqué dans la conformation de gp120 non liée à CD4.

⁷⁵¹ Amzazi, S., Ylisastigui, L., Bakri, Y., Rabehi, L., Gattegno, L., Parmentier, M., Gluckman, J. C. and Benjouad, A. (1998) *Virology* **252** (1), 96-105

⁷⁵² Burns, J. M., Gallo, R. C., DeVico, A. L. and Lewis, G. K. (1998) *J Exp Med* **188** (10), 1917-1927

⁷⁵³ Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S. and Luster, A. D. (1998) *Nature* **391** (6670), 908-911

⁷⁵⁴ Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N. P., Gerard, C., Sodroski, J. and Choe, H. (1999) *Cell* **96** (5), 667-676

⁷⁵⁵ Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (2000) *J Virol* **74** (4), 1961-1972

⁷⁵⁶ Huang, C. C., Venturi, M., Majeed, S., Moore, M. J., Phogat, S., Zhang, M. Y., Dimitrov, D. S., Hendrickson, W. A., Robinson, J., Sodroski, J., Wyatt, R., Choe, H., Farzan, M. and Kwong, P. D. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (9), 2706-2711

⁷⁵⁷ Dorfman, T., Moore, M. J., Guth, A. C., Choe, H. and Farzan, M. (2006) *J Biol Chem* **281** (39), 28529-28535

⁷⁵⁸ de Parseval, A., Bobardt, M. D., Chatterji, A., Chatterji, U., Elder, J. H., David, G., Zolla-Pazner, S., Farzan, M., Lee, T. H. and Gallay, P. A. (2005) *J Biol Chem* **280** (47), 39493-39504

⁷⁵⁹ Huang, C. C., Lam, S. N., Acharya, P., Tang, M., Xiang, S. H., Hussan, S. S., Stanfield, R. L., Robinson, J., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R., Bewley, C. A. and Kwong, P. D. (2007) *Science* **317** (5846), 1930-1934

Ces propriétés naturelles des HSPG dans l'infection par le VIH ont constitué le point de départ pour le développement d'inhibiteurs basés sur les HS.

III-3.3.2. Propriétés antivirales des mimétiques d'HS

Depuis la fin des années 80, différents travaux ont montré que l'héparine est capable, *in vitro*, d'inhiber l'infection par le VIH^{760,761,762}. Sur cette base, de nombreux polysaccharides sulfatés ont été étudiés pour leurs propriétés antivirales et ont conduit au développement de composés polyanioniques comme microbicides potentiels (cf I-4.2.).

Les **polysaccharides des algues marines** sont facilement extraits des tissus par de l'eau chaude, de l'acide dilué ou des conditions alcalines⁷⁶³. Certains de ces polysaccharides sont sulfatés ; ils sont, en général, présents en grande quantité dans la cellule où ils participent au maintien de sa structure. L'effet inhibiteur des polysaccharides des algues marines sur la réplication virale a été observé pour la première fois en 1958, contre le virus de la grippe⁷⁶⁴, puis en 1974 contre le HSV⁷⁶⁵. En 1987, une équipe a montré l'action inhibitrice de polysaccharides sulfatés issus d'une algue rouge (*Schizymenia pacifica*) contre la transcriptase inverse du VIH⁷⁶⁶. Par la suite, l'étude de divers polysaccharides sulfatés a montré que la plupart présentaient une activité anti-VIH⁷⁶¹. Les principaux polysaccharides marins présentant une activité antivirale sont les carraghénanes (extraits de l'algue rouge *Rhodophyceae*), sulfatées à environ 30%, le xylomannane (issu de l'algue rouge *Nothogenia fastigiata*), le galactane sulfate (issu de l'algue rouge *Agardhiella tenera*), le fucoïdane (extrait de l'algue brune *Fucus vesiculosus*), qui a un effet synergique avec l'AZT^{763,767}.

Le **dextran** est un polysaccharide de haut poids moléculaire, produit à partir du sucrose par de nombreuses bactéries⁷⁶³. Il est constitué d'un enchaînement de D-glucoses $\alpha(1-6)$ liés et peut différer au niveau de la longueur de la chaîne et du degré de ramification. Chimiquement, ce dextran peut être partiellement hydrolysé puis sulfaté afin d'obtenir des dextrans sulfate de différents poids moléculaires. Ces dextrans sulfate (DxS) possèdent 2 à 3 groupes sulfate par glucose. Le dextran sulfate fixe gp120, de la même façon que les HS, au

⁷⁶⁰ Ueno, R. and Kuno, S. (1987) *Lancet* **1** (8546), 1379

⁷⁶¹ Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R. and de Clercq, E. (1988) *Antimicrob Agents Chemother* **32** (11), 1742-1745

⁷⁶² Bagasra, O. and Lischner, H. W. (1988) *J Infect Dis* **158** (5), 1084-1087

⁷⁶³ Witvrouw, M. and De Clercq, E. (1997) *Gen Pharmacol* **29** (4), 497-511

⁷⁶⁴ Gerber, P., Dutcher, J. D., Adams, E. V. and Sherman, J. H. (1958) *Proc Soc Exp Biol Med* **99** (3), 590-593

⁷⁶⁵ Deig, E. F., Ehresmann, D. W., Hatch, M. T. and Riedlinger, D. J. (1974) *Antimicrob Agents Chemother* **6** (4), 524-525

⁷⁶⁶ Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. and Yamamoto, N. (1987) *Antimicrob Agents Chemother* **31** (10), 1524-1528

⁷⁶⁷ Sugawara, I., Itoh, W., Kimura, S., Mori, S. and Shimada, K. (1989) *Experientia* **45** (10), 996-998

niveau de la boucle V3^{768,769,770,771} et du site CD4i⁷⁷¹. Les données suggèrent notamment que le phénomène est basé sur une première interaction de haute affinité avec V3, suivie d'une plus faible association avec l'épitope CD4i. De plus, ces résultats montrent que les protéines gp120 de type R5 fixent ces polyanions avec une moins forte affinité que les souches X4 ou R5X4^{772,771}. A l'heure actuelle, l'utilisation du Dxs comme agent thérapeutique anti-VIH, au cours d'essais cliniques, a donné des résultats mitigés : certaines études ont conclu que le Dxs n'apportait aucun bénéfice aux patients et qu'il était même toxique⁷⁷³ alors que d'autres sont plus optimistes^{774,775}. Une des limites semble résider dans le fait que le Dxs neutralise faiblement les virus R5, les plus présents lors de la phase précoce de l'infection. Une étude récente a, cependant, montré que le Dxs, associé à d'autres inhibiteurs, était actif à la fois contre les isolats X4 et R5⁷⁷⁶. Par ailleurs, la dextrine-2-sulfate (D2S), dérivée du dextran, semble montrer une meilleure inhibition vis-à-vis du VIH (R5 et X4 confondus) et une activité anticoagulante réduite par rapport à d'autres composés sulfatés^{774,777}. Développé par la société ML Laboratories sous le nom d'Emmelle, la D2S est actuellement en essais cliniques de phase III.

Le **pentosane polysulfate (PPS)** est un polysaccharide sulfaté semi-synthétique, issu du xylane, un composé hémicellulosique constitué par un enchaînement de D-xylopyranosyl. Il a initialement été développé pour ses propriétés antitumorales et antiangiogéniques, puis a montré une activité antivirale, notamment en bloquant l'interaction du VIH avec les cellules cibles⁷⁷⁸. Il inhibe également la transcriptase inverse⁷⁷⁹ et la protéine Tat⁷⁸⁰.

Le **polysaccharide K5** d'*Escherichia coli* (cf III-1.5.3.) possède la même structure que le précurseur de l'héparine (le N-acétyl héparosane) et peut être chimiquement ou enzymatiquement modifié (N- et/ou O-sulfatations) afin de créer des motifs impliqués dans

⁷⁶⁸ Callahan, L. N., Phelan, M., Mallinson, M. and Norcross, M. A. (1991) *J Virol* **65** (3), 1543-1550

⁷⁶⁹ Harrop, H. A., Coombe, D. R. and Rider, C. C. (1994) *Aids* **8** (2), 183-192

⁷⁷⁰ Harrop, H. A. and Rider, C. C. (1998) *Glycobiology* **8** (2), 131-137

⁷⁷¹ Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) *J Virol* **74** (4), 1948-1960

⁷⁷² Lynch, G., Low, L., Li, S., Sloane, A., Adams, S., Parish, C., Kemp, B. and Cunningham, A. L. (1994) *J Leukoc Biol* **56** (3), 266-272

⁷⁷³ Flexner, C., Barditch-Crovo, P. A., Kornhauser, D. M., Farzadegan, H., Nerhood, L. J., Chaisson, R. E., Bell, K. M., Lorentsen, K. J., Hendrix, C. W., Petty, B. G. and et al. (1991) *Antimicrob Agents Chemother* **35** (12), 2544-2550

⁷⁷⁴ Stafford, M. K., Cain, D., Rosenstein, I., Fontaine, E. A., McClure, M., Flanagan, A. M., Smith, J. R., Taylor-Robinson, D., Weber, J. and Kitchen, V. S. (1997) *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **14** (3), 213-218

⁷⁷⁵ Hiebert, L. M., Wice, S. M., Jaques, L. B., Williams, K. E. and Conly, J. M. (1999) *J Lab Clin Med* **133** (2), 161-170

⁷⁷⁶ Gantlett, K. E., Weber, J. N. and Sattentau, Q. J. (2007) *Antiviral Res* **75** (3), 188-197

⁷⁷⁷ Rosenstein, I. J., Stafford, M. K., Kitchen, V. S., Ward, H., Weber, J. N. and Taylor-Robinson, D. (1998) *J Infect Dis* **177** (5), 1386-1390

⁷⁷⁸ Schols, D., Pauwels, R., Desmyter, J. and De Clercq, E. (1990) *Virology* **175** (2), 556-561

⁷⁷⁹ Sydow, G. and Klocking, H. P. (1987) *Biomed Biochim Acta* **46** (6), 527-530

⁷⁸⁰ Rusnati, M., Urbinati, C., Caputo, A., Possati, L., Lortat-Jacob, H., Giacca, M., Ribatti, D. and Presta, M. (2001) *J Biol Chem* **276** (25), 22420-22425

l'interaction avec différentes protéines⁷⁸¹. En particulier, deux dérivés de K5, K5-OS(H) et K5-N,OS(H), ont été testés comme inhibiteurs potentiels de l'infection par le VIH⁷⁸². Ces deux molécules ont une structure similaire à celle des HS (beaucoup de GlcA) et une charge globale plus négative que celle de l'héparine. Ils inhibent la fixation de gp120 aux HSPG à la surface des macrophages, qu'il s'agisse de souches R5, X4 ou R5X4. Ces deux composés sulfatés inhibent également Tat⁷⁸³.

Une partie de ces polysaccharides sulfatés a été testée en tant que microbicides et a montré un certain potentiel à bloquer l'infection par le VIH^{784,785,786,787}. Le PRO 2000 (polymère sulfoné de naphtaline), le sulfate de cellulose (CS, dérivé du coton) et le Carraguard (substance active : les carraghénanes, dérivées des algues) sont actuellement en essais cliniques de phase III^{788,789}. Néanmoins, des premiers résultats négatifs ont conduit à suspendre, en Juillet 2007, les essais cliniques réalisés avec le CS. D'autres composés ont été testés *in vitro* pour leur capacité à inhiber l'infection par le VIH : le poly(styrène 4-sulfonate) ou T-PSS, le polyméthylènehydroquinone sulfonate (PMHS), la cellulose acétate phtalate (CAP)... Leur mode d'action est, à l'heure actuelle, encore incertain. Néanmoins, ces composés, contrairement au dextran sulfate, sont actifs contre les isolats X4 et R5, suggérant que la charge de la boucle V3 ne serait pas le déterminant majeur de leur affinité⁷⁸⁶. De plus, certains de ces composés polyanioniques (T-PSS et CS) ont la particularité d'être actifs quand ils sont injectés avant l'infection, mais aussi quand ils sont ajoutés jusqu'à 8h après le début de l'infection. Cela suggère que ces microbicides potentiels agissent principalement sur l'attachement et l'entrée virale mais que certains ont également une action post-entrée. Cela pourrait venir du fait que le T-PSS et la CS se fixent à des molécules à la surface cellulaire et activent une voie de signalisation qui va inhiber une étape de la réplication virale ou alors que ces molécules peuvent être internalisées pour interagir avec d'autres cibles dans la cellule.

Quelques équipes ont observé un effet synergique entre certains de ces polysaccharides sulfatés (DxS et PRO 2000) et d'autres inhibiteurs de l'infection, incluant l'anticorps neutralisant IgG1b12, dirigé contre le site de fixation à CD4 sur gp120 et

⁷⁸¹ Vann, W. F., Schmidt, M. A., Jann, B. and Jann, K. (1981) *Eur J Biochem* **116** (2), 359-364

⁷⁸² Vicenzi, E., Gatti, A., Ghezzi, S., Oreste, P., Zoppetti, G. and Poli, G. (2003) *Aids* **17** (2), 177-181

⁷⁸³ Rusnati, M., Oreste, P., Zoppetti, G. and Presta, M. (2005) *Curr Pharm Des* **11** (19), 2489-2499

⁷⁸⁴ Pearce-Pratt, R. and Phillips, D. M. (1996) *Biol Reprod* **54** (1), 173-182

⁷⁸⁵ Stafford, M. K., Cain, D., Rosenstein, I., Fontaine, E. A., McClure, M., Flanagan, A. M., Smith, J. R., Taylor-Robinson, D., Weber, J. and Kitchen, V. S. (1997) *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **14** (3), 213-218

⁷⁸⁶ Scordi-Bello, I. A., Mosoian, A., He, C., Chen, Y., Cheng, Y., Jarvis, G. A., Keller, M. J., Hogarty, K., Waller, D. P., Profy, A. T., Herold, B. C. and Klotman, M. E. (2005) *Antimicrob Agents Chemother* **49** (9), 3607-3615

⁷⁸⁷ Gantlett, K. E., Weber, J. N. and Sattentau, Q. J. (2007) *Antiviral Res* **75** (3), 188-197

⁷⁸⁸ Mayer, K. H., Karim, S. A., Kelly, C., Maslankowski, L., Rees, H., Profy, A. T., Day, J., Welch, J. and Rosenberg, Z. (2003) *Aids* **17** (3), 321-329

⁷⁸⁹ Lederman, M. M., Offord, R. E. and Hartley, O. (2006) *Nat Rev Immunol* **6** (5), 371-382

présentant un effet microbicide *in vivo*⁷⁹⁰, le peptide dérivé de gp41 inhibiteur de la fusion (T-20), un inhibiteur de CCR5 (TAK779) et la lectine bactérienne cyanovirine-N⁷⁹¹.

L'entrée virale n'est pas la seule cible des molécules sulfatées. En effet, la protéine Tat, qui possède une séquence basique fortement conservée, se fixe aux HSPG et plusieurs composés polyanioniques peuvent inhiber son activité *in vivo* et *in vitro* : c'est notamment le cas de l'héparine, des HS, de la suramine et des molécules qui en dérivent, de la dextrine sulfate et du PPS⁷⁹². En revanche, le DxS, la β -cyclodextrine, les fragments d'héparine de faible poids moléculaire ou chimiquement désulfatés ne fixent pas Tat^{793,794,795,796}. Des études récentes ont montré l'efficacité de polymères sulfatés synthétiques pour bloquer simultanément gp120 et Tat^{797,798}.

Les molécules dérivées des HS constituent donc des inhibiteurs potentiels de l'infection par le VIH et prennent une place de plus en plus importante dans la recherche de microbicides pour bloquer l'entrée du virus dans les cellules.

⁷⁹⁰ Veazey, R. S., Shattock, R. J., Pope, M., Kirijan, J. C., Jones, J., Hu, Q., Ketas, T., Marx, P. A., Klasse, P. J., Burton, D. R. and Moore, J. P. (2003) *Nat Med* **9** (3), 343-346

⁷⁹¹ Gantlett, K. E., Weber, J. N. and Sattentau, Q. J. (2007) *Antiviral Res* **75** (3), 188-197

⁷⁹² Rusnati, M., Urbinati, C., Caputo, A., Possati, L., Lortat-Jacob, H., Giacca, M., Ribatti, D. and Presta, M. (2001) *J Biol Chem* **276** (25), 22420-22425

⁷⁹³ Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albin, A., Noonan, D., d'Adda di Fagagna, F., Giacca, M. and Presta, M. (1997) *J Biol Chem* **272** (17), 11313-11320

⁷⁹⁴ Rusnati, M., Tulipano, G., Urbinati, C., Tanghetti, E., Giuliani, R., Giacca, M., Ciomei, M., Corallini, A. and Presta, M. (1998) *J Biol Chem* **273** (26), 16027-16037

⁷⁹⁵ Rusnati, M., Tulipano, G., Spillmann, D., Tanghetti, E., Oreste, P., Zoppetti, G., Giacca, M. and Presta, M. (1999) *J Biol Chem* **274** (40), 28198-28205

⁷⁹⁶ Corallini, A., Betti, M., Rusnati, M., Campioni, D., Ciomei, M., Sola, F., Calza, N., Zauli, G., Presta, M., Barbanti-Brodano, G. and Caputo, A. (1998) *AIDS Res Hum Retroviruses* **14** (17), 1561-1571

⁷⁹⁷ Rusnati, M., Oreste, P., Zoppetti, G. and Presta, M. (2005) *Curr Pharm Des* **11** (19), 2489-2499

⁷⁹⁸ Bugatti, A., Urbinati, C., Ravelli, C., De Clercq, E., Liekens, S. and Rusnati, M. (2007) *Antimicrob Agents Chemother* **51** (7), 2337-2345

OBJECTIFS DU PROJET

Actuellement, environ 39 millions de personnes sont infectées par le VIH dans le monde et 20 millions en sont déjà décédées. Le nombre de nouveaux cas s'élève à 12000 par jour. Depuis quelques années, des traitements antirétroviraux (trithérapie) permettent de ralentir l'évolution de la maladie. Néanmoins, ces médicaments ne permettent pas d'éliminer le virus mais de vivre plus longtemps au stade séropositif, et présentent de nombreux effets secondaires. Il est donc nécessaire de poursuivre les efforts de recherche afin de mieux comprendre les mécanismes de l'infection et de mettre au point d'autres systèmes de lutte contre le VIH, en ciblant en particulier les premières étapes de l'infection.

Au cours de l'entrée du virus dans une cellule hôte, la protéine gp120 du VIH se fixe, dans un premier temps, à la surface cellulaire, au niveau de CD4, le récepteur primaire du VIH. Cette interaction provoque un changement conformationnel de gp120 et aboutit à l'exposition et/ou la formation de l'épitope CD4i, site reconnu par les chimiorécepteurs CCR5 et CXCR4 (les corécepteurs du VIH). Cette deuxième interaction active gp41 qui modifie sa structure afin de permettre à son peptide "fusogénique" de pénétrer dans la membrane cellulaire. Un dernier changement de conformation de gp41 permet le rapprochement et la fusion des deux membranes, conduisant au transfert du génome viral dans la cellule cible.

A côté de ce schéma classique, le VIH est capable de s'adsorber à la surface cellulaire *via* différents récepteurs d'attachement dont les héparanes sulfate (HS), des polysaccharides présents à la surface de nombreuses cellules. Des études ont permis de montrer que cette interaction entre le virus et les HS est réalisée, en premier lieu, par l'intermédiaire de la boucle V3 de gp120. Des résultats préliminaires obtenus au sein du laboratoire ont validé un deuxième site d'interaction avec les HS, l'épitope CD4i, constituant le site de fixation aux corécepteurs.

Mon projet de thèse a été initié à partir du postulat que **les HS pourraient entrer en compétition avec les corécepteurs pour la fixation à l'épitope CD4i**. Si l'affinité des HS pour le site CD4i est forte, ils pourraient être utilisés en qualité d'inhibiteurs de l'entrée du VIH dans la cellule. Sur ce concept, un brevet a été déposé par l'équipe, en 2002. Il porte sur un composé hybride, constitué d'un fragment de CD4 soluble couplé à un oligosaccharide d'HS. Dans cette molécule, le rôle de la partie CD4 est d'interagir avec gp120 afin de créer

l'épitope CD4i sur lequel pourra alors se fixer l'HS. Un tel composé pourrait permettre le blocage simultané des deux sites majeurs d'interaction de gp120 sur les cellules hôtes (brevet CNRS-CEA déposé le 19/04/2002 sous le n° 02 04926).

Pour concevoir une telle molécule, il est essentiel de caractériser les deux partenaires de l'interaction, à savoir les résidus de l'épitope CD4i impliqués dans l'interaction avec les HS et la taille ainsi que la nature des chaînes saccharidiques les plus appropriées pour bloquer le site CD4i. Au niveau protéique, des études de modélisation moléculaire ont permis de définir quatre résidus de CD4i comme potentiellement engagés dans la fixation des HS. Il est important de vérifier expérimentalement l'implication réelle de chacun de ces résidus dans l'interaction.

Dans ce contexte, la première étape du projet consistera à développer un système d'expression de gp120 basé sur l'utilisation de la technique « Baculovirus » (Invitrogen). Un protocole de purification en trois étapes (chromatographie échangeuse de cations, chromatographie d'affinité et chromatographie d'exclusion) sera ensuite mis au point afin d'obtenir la protéine avec une pureté suffisante pour la suite de l'étude. Les séquences protéiques impliquées dans l'interaction HS/CD4i seront ensuite étudiées. Pour cela, des expériences de mutagenèse dirigée sur les quatre résidus ciblés au niveau du site CD4i seront réalisées. L'interaction des différents mutants, produits et purifiés par les systèmes initialement développés, avec l'héparine sera analysée par résonance plasmonique de surface (technologie BIAcore) afin de mettre en évidence des résidus cruciaux pour l'interaction. En parallèle, une méthode innovante, permettant de cibler des résidus engagés dans l'interaction avec des chaînes d'héparine fixées sur des billes, sera mise au point. Cette approche permettra de vérifier les résultats obtenus avec le BIAcore et, de pointer, éventuellement, d'autres résidus impliqués dans l'interaction.

Au niveau saccharidique, des banques oligosaccharidiques puis des tests d'interaction entre gp120 et ces fragments de différentes tailles seront réalisés, afin de définir la longueur optimale de la chaîne d'HS pour inhiber l'interaction gp120/corécepteur.

Ces différentes approches ont pour but de clarifier le rôle des HS dans le processus d'attachement du virus à la surface cellulaire et de fournir des informations structurales précises permettant la définition de composés dérivés des HS capables d'inhiber le mécanisme de l'entrée virale.

MATERIEL ET METHODES

I- SYSTEME DE PRODUCTION DE PROTEINES DANS DES CELLULES S2 DE DROSOPHILES

I-1. Principe

Le « Drosophila Expression System (DES) » (Invitrogen) est basé sur la transfection de cellules Schneider 2 (S2), dérivées de *Drosophila melanogaster*, avec le vecteur d'expression pMT/BiP/V5-His, contenant le gène d'intérêt (annexe I). Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline et le promoteur de la métallothionéine (MT), inductible au sulfate de cuivre (CuSO₄). La cassette d'expression présente la séquence signal d'excrétion de la protéine de drosophile BiP en N-terminal ainsi qu'une étiquette 6-His et une étiquette épitope V5 en C-terminal. BiP code pour une protéine chaperonne se liant aux immunoglobulines. La partie de la séquence utilisée comme peptide signal code pour un peptide de 18 acides aminés.

Des lignées stables, exprimant la protéine d'intérêt, peuvent être générées en 3 à 4 semaines en cotransfectant les cellules S2 avec le vecteur d'expression et un vecteur de sélection pCoHygro, contenant le gène de résistance à l'hygromycine (annexe I).

I-2. Clonage

La figure 30 résume les différentes étapes de clonage réalisées pour créer le plasmide pMT-BiP-gp120.

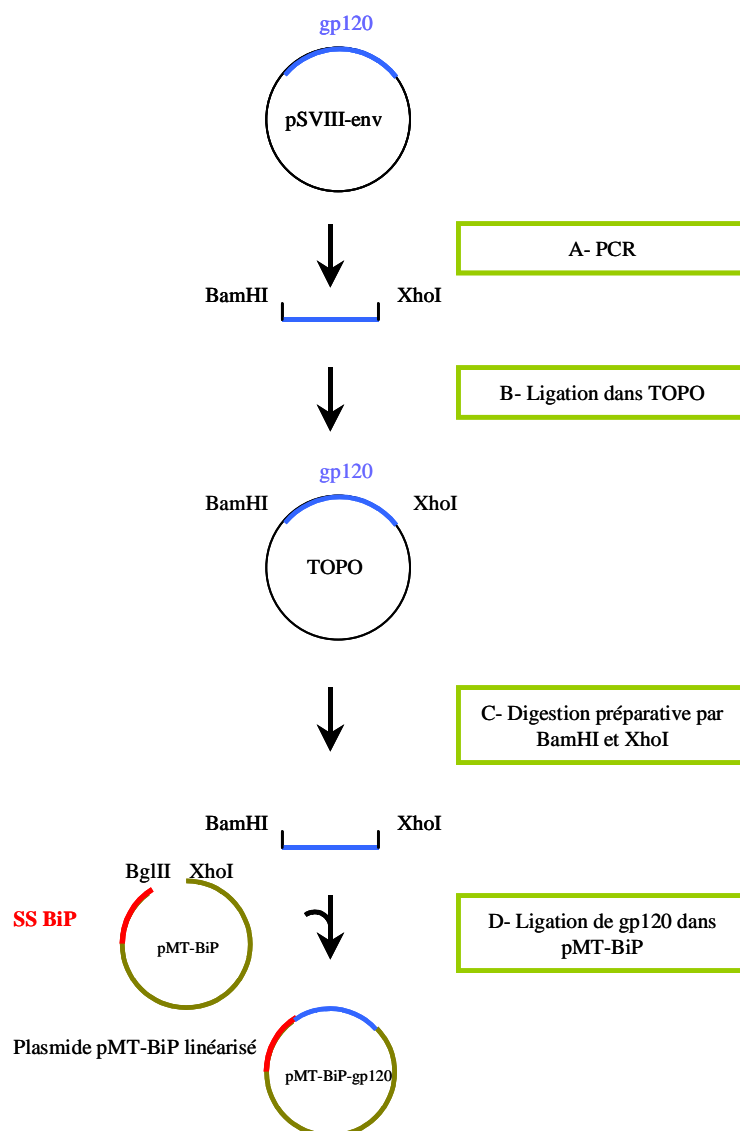


Figure 30 : schéma des étapes de clonage réalisées afin de générer pMT-BiP-gp120

SS BiP : séquence signal de BiP

I-2.1. Amplification de l'insert par PCR

Le plasmide pSVIII-env, contenant les gènes du VIH *rev* et *env* (isolat HXBc2, souche virale X4 standard adaptée en laboratoire), a été fourni par Q. Sattentau (Oxford). La séquence correspondant au gène codant pour gp120 ([annexe II](#)), déléte de sa séquence signal, est amplifiée par PCR, à partir du plasmide pSVIII-env ([figure 30A](#)). Pour cela, on utilise l'amorce gp1, contenant un site de restriction *Bam*HI, afin de cloner gp120 directement en aval de la séquence signal BiP, et l'amorce gpS2-2, contenant un site de restriction *Xho*I et un codon stop ([annexe III](#)).

La PCR est réalisée avec 125 ng de chaque amorce, 100 ng de plasmide, 1 µL de dNTP mix (Stratagene), 5 µL de tampon 10X (Stratagene) et 2,5 U de PfuUltra High-Fidelity DNA polymerase (Statagene) dans un volume total de 50 µL.

Le mélange réactionnel est soumis à une dénaturation à 95°C pendant 8 min avant d'ajouter le mélange de dNTP et l'enzyme. L'amplification est conduite pendant 30 cycles de 30 s à 95°C, 1 min à 50°C et 5 min à 68°C, suivis d'une élongation finale de 10 min à 68°C.

I-2.2. Clonage indirect dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO

La ligation dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO (figure 30B) est réalisée selon les conditions décrites dans le « Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit » (Invitrogen) en incubant, 5 min à température ambiante, 3 µL de produit PCR obtenu lors de l'amplification décrite ci-dessus, 1 µL de solution de NaCl, 1 µL d'H₂O et 1 µL de vecteur pCR4Blunt-TOPO.

I-2.2.1. Transformation de bactéries compétentes avec la ligation

Des bactéries compétentes TOP10 (50 µL) sont transformées avec 4 µL de la ligation (60 s à 42°C). Après ajout de 250 µL de SOC (Invitrogen), le mélange est incubé 1 h à 37°C, sous agitation à 200 tours/min. Les bactéries sont enfin étalées sur des boîtes de pétri LB-agar complémenté par 50 µg/mL de kanamycine et le tout est incubé une nuit à 37°C.

I-2.2.2. Isolement de l'ADN plasmidique produit par les bactéries

Dix colonies sont piquées et inoculées dans des tubes de 5 mL de LB - kanamycine (50 µg/mL), pendant une nuit à 37°C, sous agitation. L'ADN plasmidique est purifié selon le protocole décrit dans le système de purification « Wizard Plus SV Miniprep » (Promega). Son principe repose sur une lyse alcaline des bactéries et une purification du lysat sur une résine échangeuse d'anions qui retient sélectivement l'ADN. Après les lavages, l'ADN plasmidique est élué avec 50 µL d'eau.

I-2.2.3. Confirmation de la présence de l'insert dans le vecteur TOPO

L'ADN purifié à partir de chacune des 10 colonies est digéré par les enzymes de restriction BamHI et XhoI (10 U/µL - Roche) (2 µL d'ADN, 1 µL de tampon B, 0,5 µL de chaque enzyme, qsp 10 µL H₂O) 1 h à 37°C. Les produits digérés sont repris dans du tampon de charge Blue/Orange 6X (Promega – 2 µL pour 10 µL d'échantillon) et séparés sur gel d'agarose 1% en tampon TAE 0,5X, puis traités au BET afin de vérifier la présence de l'insert.

I-2.3. Clonage dans le vecteur pMT/BiP/V5/HisA

L'ADN du clone positif retenu est ensuite digéré en plus grande quantité (figure 30C) par les enzymes BamHI et XhoI (16 µl d'ADN, 3 µL de tampon B, 2 µL de chaque enzyme puis à nouveau 2 µL de chaque enzyme 1h30 après, qsp 30 µL H₂O) 3 h à 37°C. Le mélange est soumis à une déphosphorylation en 5' afin d'éviter la recircularisation du plasmide, en ajoutant 1 µL de phosphatase alcaline bovine (CIP pour *calf intestinal phosphatase* – New England Biolabs), pendant 1 h à 37°C. En parallèle, le vecteur pMT/BiP/V5/HisA est digéré dans les mêmes conditions par les enzymes de restriction BglII et XhoI (10U/µL - Roche).

Rmq : BamHI et BglII créent des sites recombinables entre eux.

Les deux produits de digestion sont ensuite purifiés selon les conditions décrites dans le « QIAquick PCR Purification Kit » (Qiagen). Brièvement, l'ADN digéré est déposé sur une colonne de silice. Dans des conditions de sels et de pH définies par l'utilisation des tampons du kit, l'ADN s'adsorbe à la résine alors que les impuretés sont éliminées par lavage de la colonne avec une solution d'éthanol. L'ADN purifié est ensuite élué dans 50 µL d'eau.

La ligation de l'insert (figure 30D) dans le plasmide pMT/BiP/V5/HisA linéarisé est effectuée avec le « Rapid DNA Ligation Kit » (Roche) selon les conditions suivantes : 1 µL de plasmide pMT/BiP/V5/HisA digéré, 7 µL d'insert, 2 µL de tampon 2, 10 µL de tampon 1, 1 µL de ligase, 30 min à température ambiante.

Des bactéries TOP10 sont ensuite transformées avec le produit de ligation, étalées sur des boîtes de pétri LB-agar-ampicilline (100 µg/mL) et incubées une nuit à 37°C.

Les clones positifs sont détectés comme décrit précédemment en purifiant l'ADN plasmidique, puis en le digérant avec l'enzyme de restriction pstI (10 U/µL - Roche) afin de vérifier la présence de l'insert. Les produits digérés sont analysés sur gel d'agarose 1%. Enfin, le clone positif retenu est séquencé (Génome Express, Grenoble).

I-3. Culture cellulaire

I-3.1. Culture des cellules S2

Il s'agit d'une lignée cellulaire dérivée d'une culture primaire de cellules embryonnaires de *Drosophila melanogaster* âgées de 10 à 24 heures, réalisée en 1972 par M. Schneider. Ce sont des cellules semi-adhérentes, cultivées à 28°C en absence de CO₂.

Les cellules S2 sont cultivées dans du milieu « Schneider's Drosophila Medium »

(Invitrogen), additionné de 10% de sérum de veau fœtal et d'un mélange pénicilline-streptomycine (P=100 U/mL et S=100 µg/mL). Ce milieu sera noté « milieu de Schneider complet » par la suite. Un passage au 1:10 est réalisé tous les 3 à 4 jours.

I-3.2. Transfection – Sélection

Les transfections de cellules S2 sont réalisées avec le « Calcium Phosphate Transfection Kit » (Invitrogen). Une plaque de culture de 6 puits (Ø 35 mm) contenant, dans chaque puits, $3 \cdot 10^6$ cellules dans 3 mL de milieu de Schneider complet est incubée 16 à 24 h à 28°C. Une solution A (36 µL de 2 M CaCl_2 , 19 µg (resp. 19,5 µg) de plasmide d'expression pMT/BiP/V5/HisA-gp120, 1 µg (resp. 0,5 µg) de plasmide de sélection pCoHygro, H_2O qsp 300 µL) est ajoutée lentement à une solution B de HBS (Hepes Buffered Saline 300 µL - composition : 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 280 mM NaCl, pH 7,1).

Quatre conditions de transfection (solution A) sont réalisées :

- un témoin négatif (sans ADN)
- une transfection avec le vecteur de sélection pCoHygro seul, possédant le gène de résistance à l'hygromycine (1 µg)
- une cotransfection avec le vecteur d'expression (19 µg) et de sélection (1 µg)
- une cotransfection avec le vecteur d'expression (19,5 µg) et de sélection (0,5 µg)

Après une incubation de 30 à 40 minutes à température ambiante (apparition d'un léger précipité), le mélange A+B (600 µL) est ajouté goutte à goutte aux cellules S2. Le précipité de phosphate de calcium (CaPO_4), formé par le mélange de A et B, se fixe sur l'ADN, le tout mimant ainsi une structure nucléosomique, phagocytée par les cellules. Après une incubation de 24 h à 28°C, les cellules transfectées sont lavées deux fois afin d'éliminer le CaPO_4 , puis remises en culture 2 jours à 28°C.

Les cellules sont ensuite sélectionnées à l'hygromycine (300 µg/mL) dans le but d'éliminer les cellules non transfectées, ou transfectées avec le vecteur d'expression seul. Cette méthode permet d'obtenir des lignées transfectées stables en 3 à 4 semaines. Au cours de cette sélection, le milieu de Schneider complet et l'agent de sélection sont renouvelés tous les 3 à 4 jours, les cellules ne sont pas divisées et sont remises en culture dans les mêmes puits.

Enfin, les cellules sont peu à peu divisées, d'abord au 1:2 puis au 1:5 afin d'éliminer les cellules mortes et d'accroître la population de cellules sélectionnées.

I-3.3. Optimisation des conditions d'expression de la protéine

Pour vérifier que gp120 est exprimée et sécrétée dans le milieu, les cellules sont induites au CuSO₄ (1 mM final, 72 h), puis un Western Blot est réalisé sur 50 µL de surnageant de culture. Cette induction est effectuée sur des cellules cultivées dans du milieu de culture sans hygromycine et sans sérum afin de minimiser la quantité de protéines sériques présentes dans le milieu. Un test cinétique préalable a permis de déterminer le meilleur temps d'induction et la concentration d'inducteur optimale. Pour le réaliser, 2.10⁶ cellules ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits (Ø 35mm), dans du milieu de Schneider dépourvu de sérum et d'agent de sélection, et mises en culture 24 h à 28°C. L'expression de gp120 a ensuite été induite en ajoutant 500 µM final de CuSO₄ (concentration préconisée par Invitrogen) dans chaque puits. Le surnageant de culture d'un puits a été prélevé toutes les 24 h, entre 0 et 96 h, puis centrifugé pour éliminer les cellules en suspension. Une détection par Western Blot a été réalisée sur 50 µL de chaque aliquot. Puis, un deuxième test, réalisé en induisant les cellules avec différentes concentrations de CuSO₄ (0 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ou 2 mM final), pendant le temps optimal défini précédemment, a permis de définir la concentration d'inducteur adéquate.

II- SYSTEME DE PRODUCTION DE PROTEINES AVEC LA TECHNOLOGIE « BACULOVIRUS »

II-1. Principe

Cette technique est basée sur la transposition spécifique d'un transposon, contenant le gène d'intérêt, dans un bacmide qui peut se répliquer dans *E.coli* et qui contient l'intégralité du génome d'un baculovirus. Cette technique nécessite deux outils : le vecteur pFastBac (ou un dérivé, ici pNT-Bac) et les bactéries DH10Bac.

Le **vecteur pFastBac** (annexe I - Invitrogen) permet le clonage du gène d'intérêt. Ce vecteur contient les éléments transposables du transposon Tn7 (Tn7R et Tn7L) entre lesquels se trouvent le gène de résistance à la gentamicine, le promoteur de la polyhédrine contrôlant l'expression du gène étranger, un site multiple de clonage et le signal de terminaison de la transcription SV40 poly(A). Le gène, une fois cloné, est alors sous le contrôle du promoteur fort de la polyhédrine entre les éléments transposables Tn7. Le **vecteur pNT-Bac** (Rossi *et al.*, 1998) est dérivé du vecteur pFastBac et contient la séquence signal de la melittine en amont du site de clonage. Sa construction est détaillée en annexe I. Les **bactéries DH10Bac**, utilisées pour réaliser la transposition, contiennent le bacmide et un plasmide « helper » qui

fournit en *trans* les éléments nécessaires à la transposition tout en conférant à la bactérie la résistance à la tétracycline. Le bacmide possède le génome d'un baculovirus modifié dans lequel sont insérés, à la place du gène de la polyhédrine, une origine de répllication mini-F, un marqueur de résistance à la kanamycine et les sites receveurs du transposon Tn7 insérés dans la sous-unité α de la β -galactosidase. Lorsque la transposition de l'élément mini-Tn7 a lieu dans le bacmide, la phase de lecture de la sous-unité α n'est plus conservée. Cette étape permet un criblage bleu/blanc des colonies, les blanches possédant le gène d'intérêt, intégré dans le bacmide. Des cellules d'insecte Sf21 sont ensuite transfectées avec le bacmide, afin de produire les baculovirus recombinants. Une fois le stock de baculovirus amplifié, il est utilisé pour infecter des cellules afin de produire et sécréter gp120 dans le milieu de culture. La figure 31 récapitule les différentes étapes réalisées pour construire les bacmides recombinants.

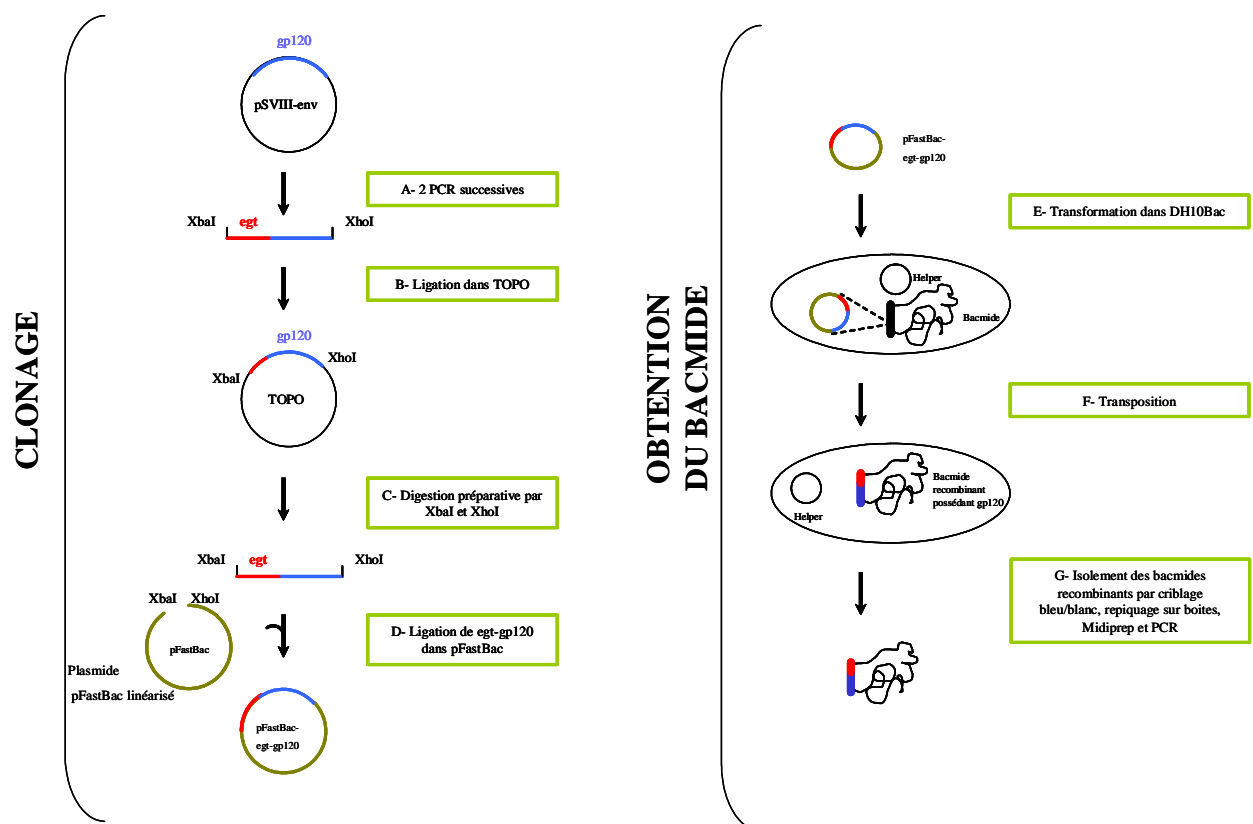


Figure 31 : schéma des étapes de clonage réalisées pour créer le bacmide recombinant

Le schéma explique les étapes réalisées avec pFast-Bac, l'obtention des bacmides à partir de pNT-Bac étant identique.

II-2. Clonage

II-2.1. Construction de *pFastBac-gp120*

Le vecteur pFastBac ne contient pas de séquence signal de sécrétion ; le clonage va donc permettre d'amplifier gp120 tout en insérant la séquence signal d'egt (Ecdysteroid UDP-glucosyl transferase), une protéine de baculovirus. Cette séquence signal étant trop longue pour être contenue dans une amorce, deux amorces chevauchantes sont dessinées : egt1, contenant le site de restriction XbaI, et egt2 ([annexe III](#)).

La séquence de gp120, déléetée de son peptide signal, est amplifiée à partir du plasmide pSVIII-env, par deux PCR successives ([figure 31A](#)), en utilisant les amorces egt2 et gpS2-2 (XhoI), puis les amorces egt1 (chevauchant egt2) et gpS2-2. Entre les deux PCR, le produit amplifié est purifié à l'aide du kit « QIAquick PCR Purification Kit » (Qiagen). Les PCR, la ligation dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO ([figure 31B](#)), la transformation de bactéries compétentes TOP10 avec le produit de ligation ainsi que l'isolement de l'ADN plasmidique produit par les bactéries sont réalisés selon les conditions décrites précédemment (II-2.2.).

Afin de confirmer la présence de l'insert dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO, l'ADN purifié correspondant à chacune des dix colonies prélevées est digéré par les enzymes de restriction XbaI et XhoI. Les produits digérés sont séparés sur gel d'agarose 1%. L'ADN du clone positif retenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction XbaI et XhoI à plus grande échelle ([figure 31C](#)) (cf I-2.3.). Le mélange est traité avec 1 µL de CIP pendant 1 h à 37°C. En parallèle, le vecteur pFastBac est également digéré par les enzymes de restriction XbaI et XhoI. Les deux produits de digestion sont ensuite purifiés.

La ligation de l'insert dans le plasmide pFastBac linéarisé ([figure 31D](#)), puis la transformation des bactéries avec le produit de ligation, sont effectuées comme décrit précédemment (cf I-2.3.). Les clones positifs sont détectés en purifiant l'ADN plasmidique, puis en le digérant avec les enzymes de restriction XbaI et XhoI, afin de vérifier la présence de l'insert. Les produits digérés sont séparés sur gel d'agarose 1% et le clone positif retenu est envoyé à séquencer (Génome Express).

II-2.2. Construction de *pNT-Bac-gp120*

Le vecteur pNT-Bac-gp120 est construit sur le même modèle que pFastBac-gp120 :

- PCR avec les amorces gp1 (BamHI) et gp2 (HindIII)
- Ligation dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO
- Restriction par BamHI et HindIII pour isoler l'insert

- Restriction de pNT-Bac par BamHI et HindIII
- Ligation de l'insert dans pNT-Bac
- Séquençage du plasmide (Génome Express).

II-3. Génération du bacmide recombinant

Des bactéries DH10Bac (50 µL) sont transformées avec 10 ng de pFastBac-gp120 (resp. pNT-Bac-gp120), par choc thermique pendant 45 s à 42°C (figure 31 E,F). Le mélange est ensuite additionné de 450 µL de SOC et incubé 4 h à 37°C, sous agitation. Dix, 20 ou 50 µL (qsp SOC 100 µL) du mélange sont étalés sur des boîtes de pétri « Bac-to-Bac » (LB-agar complété par 50 µg/mL de kanamycine, 7 µg/mL de gentamycine, 10 µg/mL de tétracycline, 100 µg/mL de Bluo-Gal et 40 µg/mL d'IPTG). La kanamycine permet de sélectionner les bactéries possédant le bacmide, la gentamycine, les bactéries ayant intégré la partie de pNT-Bac située entre les éléments transposables et la tétracycline, les bactéries possédant le plasmide « helper » nécessaire à la transposition. L'IPTG permet d'induire l'expression de la β -galactosidase. Le Bluo-Gal est le substrat de la β -galactosidase ; il est dégradé en galactose et en un composé bleu. Après incubation une nuit à 37°C, si l'insert a été transposé dans le bacmide, les bactéries transformées seront lac- et apparaîtront blanches, alors que si la transposition n'a pas eu lieu, les colonies seront bleues.

Une trentaine de colonies bien blanches et bien rondes sont prélevées et repiquées en parallèle sur des boîtes LB - ampicilline (100 µg/mL) et sur des boîtes Bac-to-Bac (figure 31G). Cette étape a été ajoutée dans le but d'éviter les faux positifs. Les clones positifs sont sensibles à l'ampicilline (pas de colonie sur les boîtes Amp) et doivent apparaître blancs sur les boîtes Bac-to-Bac. Après incubation une nuit à 37°C, trois clones positifs sont inoculés dans 3 mL de milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine, 7 µg/mL de gentamycine et 10 µg/mL de tétracycline. Les cultures bactériennes sont incubées 7 h à 37°C sous agitation (200 rpm) puis transférées dans 150 mL de milieu LB identique. Les bacmides sont purifiés selon le protocole décrit dans le système de purification « Wizard Plus Midiprep » (Promega).

La transposition de l'insert dans le bacmide est vérifiée par PCR en utilisant des amorces situées sur le bacmide de part et d'autre de l'insert (figure 32) :

- 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega)
- 1,5 µL de chaque amorce M13 reverse et M13 forward (10 µM)
- 2 µL de bacmide
- qsp 25 µL H₂O

Le mélange réactionnel est soumis à une dénaturation à 95°C pendant 8 min et l'amplification est conduite pendant 35 cycles de 45 s à 95°C, 55 s à 55°C et 5 min à 72°C, suivis d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

Dix microlitres du produit de la PCR sont ensuite analysés sur un gel d'agarose 1% afin de vérifier la présence de l'insert dans le bacmide. Pour un clone positif, le fragment attendu correspond à un fragment de la taille de l'insert + 2300 pb, soit 3700 pb.

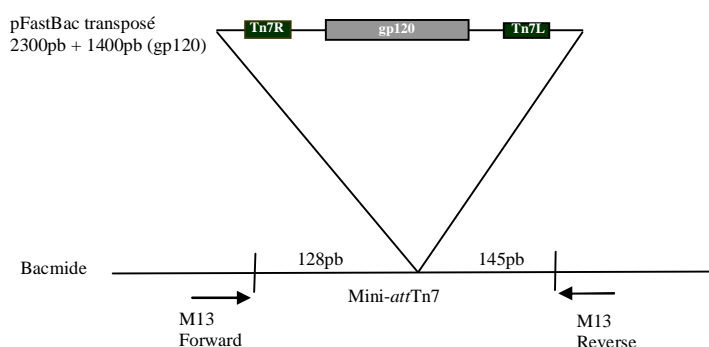


Figure 32 : principe de l'amplification avec les amorces M13

Les amorces M13 s'hybrident sur le bacmide, de part et d'autre des sites receveurs du transposon Tn7 insérés dans la sous-unité α de la β -galactosidase (mini-attTn7). Si la transposition a eu lieu, l'insert amplifié est constitué d'une partie de la sous unité α de la β -galactosidase, dans laquelle s'est insérée la partie de pFastBac située entre les éléments transposables, longue de 2300 pb + 1400 pb de base correspondant au gène codant pour gp120. Si la transposition n'a pas eu lieu, seul le mini-attTn7 est amplifié : cela correspond à un fragment d'environ 300 pb.

II-4. Culture cellulaire

La [figure 33](#) résume les étapes de culture cellulaire aboutissant à la production de la protéine.

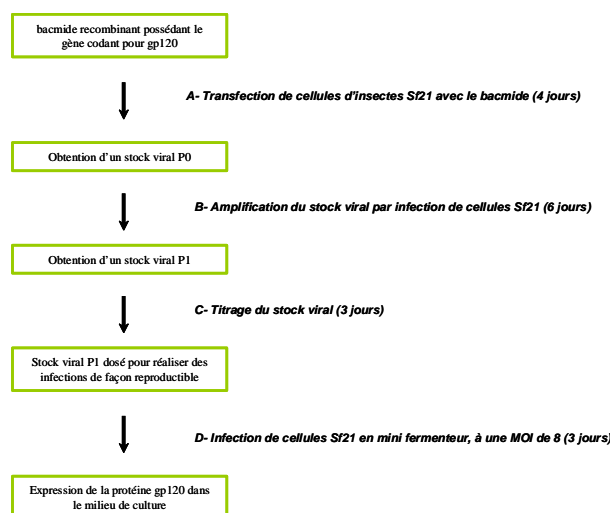


Figure 33 : schéma des étapes de culture cellulaire réalisées pour produire gp120

II-4.1. Culture des cellules

Les cellules Sf9, Mimic Sf9 et Sf21, cellules ovariennes de lépidoptère *Spodoptera frugiperda*, et les cellules High Five (HF), cellules d'oeufs de *Trichoplusia ni*, sont cultivées en culture stationnaire, à 27°C, dans du milieu Sf-900 II SFM (Invitrogen) pour les Sf9 ou dans du milieu TC100 (Invitrogen) complémenté avec 5% de SVF pour les Sf21 et avec 10% de SVF pour les HF et les Mimic Sf9. Ces deux milieux sont additionnés d'un mélange pénicilline/streptomycine (P=100 U/mL et S=100 µg/mL – Invitrogen). La transfection et l'amplification des virus recombinants sont réalisées dans des cellules Sf21, dans du milieu Sf-900 II SFM, et l'expression des protéines recombinantes dans des cellules Sf9, Mimic Sf9, Sf21 ou HF (tableau VII).

Type cellulaire	Maintien	Transfection	Amplification	Production
Sf9	Sf-900 II SFM-P/S	/	/	Sf-900 II SFM-P/S
Sf21	TC100-5% SVF-P/S	Sf-900 II SFM	Sf-900 II SFM-P/S	Sf-900 II SFM-P/S
HF	TC100-10% SVF-P/S	/	/	Sf-900 II SFM-P/S
Mimic Sf9	TC100-10% SVF-P/S	/	/	TC100-10% SVF-P/S

Tableau VII : tableau des milieux de culture cellulaire utilisés

SVF : sérum de veau fœtal, P/S : pénicilline/streptomycine

Ces quatre types cellulaires sont adhérents. Leur maintien s'effectue en flasques, en divisant les cellules au 1/10^{ème}, tous les 3 à 4 jours.

II-4.2. Transfection

Les cellules Sf21 sontensemencées à 2,5.10⁶ cellules par boîte (T25 cm²) dans du milieu TC100-5% SVF-P/S, 24 h avant la transfection.

Pour la transfection (figure 33A), 20 µL de bacmide dilués dans 500 µL de Sf-900 II SFM dépourvu de P/S sont mélangés à 20 µL d'une suspension de liposomes (CellFECTIN, Invitrogen) diluée dans 500 µL de Sf-900 II SFM dépourvu de P/S. Le mélange est incubé 30 min à température ambiante, puis additionné de 1 mL de Sf-900 II SFM et déposé sur les cellules Sf21 préalablement rincées avec du milieu Sf-900 II SFM. Après 6 heures d'incubation à 27°C, le mélange de transfection est remplacé par 8 ml de Sf-900 II SFM-P/S et l'incubation est poursuivie jusqu'à 96 heures. Enfin, le surnageant est récolté, centrifugé à 1500 rpm pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires et stocké à 4°C à l'abri de la lumière. Ce premier stock viral est appelé P0.

II-4.3. Amplification du stock viral

P0 ne contient qu'une faible quantité de virus, qui est amplifié en infectant des cellules Sf21 ([figure 33B](#)). Brièvement, 1,2 mL de P0 additionné de 4,8 mL de Sf-900 II SFM P/S sont ajoutés à $2,3 \cdot 10^7$ cellules ($T175\text{cm}^2$) pendant 1 h à température ambiante. Puis, 30 mL de Sf-900 II SFM P/S sont ajoutés et l'infection est poursuivie 6 jours à 27°C.

De la même façon que pour P0, le surnageant est prélevé, centrifugé, puis stocké à 4°C à l'obscurité. Cette étape d'amplification permet d'obtenir un stock viral P1, plus concentré en virus, qui servira à infecter les cellules pour produire la protéine.

II-4.4. Titrage du virus recombinant

Pour définir la MOI (*Multiplicity Of Infection*), le stock viral amplifié (P1) est titré par la méthode des plages de lyse ([figure 33C](#)).

Des cellules Sf21 sontensemencées à $2 \cdot 10^6$ cellules/2 mL dans du milieu TC100-5% SVF (environ 80% de confluence), dans quatre boîtes de culture (\varnothing 35 mm). Après 3 h d'incubation à température ambiante, le milieu est éliminé et 100 μL de dilutions progressives de P1 (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-5} et 10^{-6}) sont ajoutés aux cellules qui sont ensuite incubées 1 h à 27°C. Les dilutions sont réalisées dans du TC100 sans SVF car le sérum peut perturber l'infection par certains virus. L'inoculum est ensuite retiré et 1 mL d'agarose low melting 3% (Invitrogen) contenant 50% de milieu TC100-20% SVF (soit 10% final) est coulé dans chaque boîte. La gélose est recouverte avec 1 mL de TC100-10% SVF. Les cellules sont enfin incubées à 27°C. Deux à trois jours après l'infection, les cellules vivantes sont colorées par ajout de 1 mL d'une solution de rouge neutre à 0,16% final. Au bout de 5 h, le colorant est éliminé et les plages de lyse sont dénombrées sur chaque boîte. Une plage de lyse correspond à l'infection d'une cellule par un virus puis la propagation de l'infection aux cellules avoisinantes. Le nombre de plages de lyse à une dilution donnée permet l'expression du titre de l'inoculum en unités formant plages ou *plaque forming unit* par mL (pfu/mL).

Titre viral (pfu/mL) = nombre de plages de lyse * dilution * 10 (infection réalisée avec 100 μL d'inoculum)

La MOI correspond au nombre de plages de lyse par cellule. Elle s'exprime en pfu/cellule. **MOI = (volume d'inoculum * titre viral) / nombre de cellules**

Classiquement, les amplifications sont réalisées avec une MOI variant entre 0,01 et 1 et les productions avec une MOI située entre 1 et 10. Ici, on a défini une MOI de 0,5 pour les amplifications et de 8 pour les productions.

II-4.5. Production de la protéine

Différentes conditions de production de gp120 ont été expérimentées : quatre types cellulaires ont été testés (cellules HF, Sf9, Mimic Sf9 ou Sf21), en monocouche et/ou en suspension (figure 33D).

II-4.5.1. Protocole de production pour des cellules en monocouche

Des cellules HF, Sf9, Mimic Sf9 ou Sf21 sontensemencées à $1,75 \cdot 10^7$ cellules/boîte (T175 cm²) dans du milieu Sf900 II SFM-P/S (ou dans du milieu TC100-10% SVF-P/S pour les Mimic Sf9) et incubées 2 h à 27°C. Une fois que les cellules ont adhéré, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont infectées avec le stock viral titré, à une MOI de 8, pendant 2 h à température ambiante. L'inoculum est remplacé par 30 à 35 mL de milieu de culture adéquat et les cellules sont incubées environ 72 h à 27°C. Le surnageant est enfin prélevé, centrifugé, additionné d'antiprotéases (Complete – Roche) et stocké à 4°C, à l'abri de la lumière.

Une cinétique d'infection a, au préalable, été effectuée pour définir le temps optimal d'infection. Cette cinétique a été réalisée de la façon décrite ci-dessus, en prélevant 1 mL de surnageant de culture toutes les 24 h entre 0 et 120 h. Une détection par Western Blot a été faite sur ces différents aliquots.

II-4.5.2. Protocole de production pour des cellules en suspension

Les cellules (Sf21 ou HF) sont adaptées en mini-fermenteur, une semaine avant l'infection. Les cellules sontensemencées à $0,5 \cdot 10^6$ cellules/mL dans du TC100-5% SVF et incubées 72 h à 27°C. Elles sont ensuite centrifugées (5 min, 1200 rpm) et infectées à une MOI de 8, pendant 1 h, à température ambiante. Puis, du milieu Sf900 II SFM-P/S est ajouté afin de diluer les cellules à $0,5 \cdot 10^6$ cellules/mL et les cellules sont remises en culture 72 h en mini-fermenteur. Le milieu de culture (1 L) est enfin prélevé, centrifugé, additionné d'antiprotéases (Complete - Roche - 3 pastilles/L de culture) et stocké à 4°C, à l'abri de la lumière, ou congelé à -20°C si la purification n'est pas immédiate. Une cinétique d'infection a également été effectuée pour définir le temps optimal d'infection.

III- ELECTROPHORESE ET IMMUNODETECTION DES PROTEINES

III-1. Analyse des protéines par électrophorèse

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) permet de séparer les polypeptides en fonction de leur poids moléculaire⁷⁹⁹. Les échantillons sont repris dans du tampon de dépôt 5X (Tris-HCl 30 mM, SDS 1% (m/v), Bleu de bromophénol 0,1% (m/v), glycérol 5%, pH 6,8). Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration contenant 5% (v/v) d'acrylamide 37,5:1 et d'un gel de séparation contenant 10% (v/v) d'acrylamide 37,5:1 (annexe III). Un marqueur de poids moléculaire coloré (PageRuler Prestained Protein Ladder – Fermentas) permet de suivre la migration et d'estimer le poids moléculaire des protéines des échantillons analysés. L'électrophorèse est conduite à ampérage constant (25 mA) dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%). Après électrophorèse, les protéines peuvent être transférées sur une membrane pour permettre un immuno-marquage avec un anticorps spécifique ou colorées au bleu de Coomassie. Le gel est alors incubé pendant 20 min dans du milieu de coloration (bleu de Coomassie R250 1 g/L, méthanol 50% (v/v), acide acétique 8% (v/v)), puis décoloré par des lavages successifs dans du tampon de décoloration (éthanol 10%, acide acétique 7%).

III-2. Révélation des protéines par Western Blot

Les polypeptides séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes sont transférés électriquement sur une membrane de PVDF (Sequi-Blot PVDF Membrane 0,2 µm - Biorad) pendant 1h30 à 4°C sous voltage constant (100 V) dans le tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM). La membrane est ensuite saturée en protéines dans un tampon TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) contenant 5% (m/v) de lait écrémé déshydraté, pendant 1 h, sous agitation à température ambiante, puis incubée pendant 1 h dans une solution de TBS - tween 20 0,5% - lait écrémé 5% et un anticorps primaire polyclonal de chèvre dirigé contre gp120 (Biodesign International, USA – 1/2000). Les anticorps non fixés sont éliminés par trois lavages successifs de la membrane dans un tampon TBS-tween 0,5%. La membrane est ensuite incubée 1 h dans du TBS - tween 20 0,5% - lait écrémé 5% et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre, couplé à la

⁷⁹⁹ Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227** (5259), 680-685

« HorseRadish Peroxydase » (Jackson ImmunoResearch – 1/5000). Après incubation en présence du deuxième anticorps, la membrane est lavée entre trois et cinq fois pendant 10 min dans du TBS-tween 0,5%. La révélation est effectuée par la technique ECL (Enhanced Chemiluminescence – Amersham Biosciences) : en présence des réactifs ECL, la peroxydase catalyse la libération de lumière qui permet l'impression d'un film d'autoradiographie (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences).

IV- MUTAGENESE DIRIGEE

Le kit de mutagenèse dirigée « QuickChange » (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit - Stratagene) permet de créer des mutations ponctuelles en modifiant la nature d'un acide aminé, ou d'insérer/déléter un ou plusieurs acides aminés. Cette méthode utilise les performances de la PfuUltra DNA Polymerase qui réplique les deux brins d'un ADN plasmidique avec une haute fidélité à partir de deux oligonucléotides synthétiques contenant chacun la mutation désirée. Ces oligonucléotides sont complémentaires entre eux et s'hybrident sur chacun des brins du plasmide. Ils sont allongés par la PfuTurbo DNA Polymerase et génèrent un plasmide muté. Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction DpnI qui reconnaît spécifiquement l'ADN méthylé ou hémi-méthylé. L'ADN parental, non porteur de la mutation, est ainsi éliminé sélectivement. A l'issue de cette digestion, l'ADN plasmidique néosynthétisé est introduit par transformation chez la bactérie *E. coli* qui répliquera le plasmide mutant (annexe IV).

Parmi les acides aminés basiques du site CD4i de gp120, quatre sont suspectés d'être directement impliqués dans l'interaction avec les HS: il s'agit de K121, R419, K421 et K432⁸⁰⁰. L'objectif est donc de muter un ou plusieurs de ces acides aminés afin de vérifier cette hypothèse.

Des amorces sont dessinées en suivant les critères mentionnés dans le « QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit », puis synthétisées par MWG Biotech. Leurs séquences sont représentées dans le tableau VIII.

⁸⁰⁰ Vives, R. R., Imberty, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (22), 21353-21357

K121S sens	5'-GCCTAAAGCCATGTGT AAAGCTT AACCCCACTCTGTG-3'	HindIII
K121S antisens	5'-CACAGAGTGGGGTT AAAGCTT ACACATGGCTTTAGGC-3'	HindIII
K419S sens	5'-CAATCACCTCC CTGCAG CATAAAACAAATTATAAACATGTGGC-3'	PstI
K419S antisens	5'-GCCACATGTTTATAATTGTTTAT GCTGCAG GGGAGGGTGATTG-3'	PstI
K412S sens	5'-CAATCACCTCC CTGCAG AATAA GCC AAATTATAAACATGTGGC-3'	PstI
K421S antisens	5'-GCCACATGTTTATAATTG GCTTAT GCTGCAG GGGAGGGTGATTG-3'	PstI
K432S sens	5'-CATGTGGCAGAAAGTAG GATCC GCAATGTATGCCCTC-3'	BamHI
K432S antisens	5'-GAGGGGCATACATTGC GGATCCT ACTTTCTGCCACATG-3'	BamHI
R419-K421S sens	5'-CAATCACCTCC CTGCAG CATA GCC AAATTATAAACATGTGGC-3'	PstI
R419-K421S antisens	5'-GCCACATGTTTATAATTG GCTTAT GCTGCAG GGGAGGGTGATTG-3'	PstI

Tableau VIII : amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

En rouge : mutations ; En gras, souligné : site de restriction créé

Cinq couples d'amorces sont synthétisés pour créer une protéine mutée sur la lysine 121 (K121S), sur l'arginine 419 (R419S), sur la lysine 421 (K421S) ou sur la lysine 432 (K432S), ainsi qu'une protéine mutée sur l'arginine 419 et la lysine 421 (R419S-K421S) (les bases mutées sont représentées en rouge dans le tableau VIII). La combinaison de ces couples d'amorces permet également de créer un triple (K121S-R419S-K421S) et un quadruple mutant (K121S-R419S-K421S-K432S). Les acides aminés mutés sont remplacés par des sérines, un acide aminé hydrophile et peu chargé. Des sites de restriction sont créés en même temps que les mutations, afin de vérifier par simple digestion enzymatique que les bactéries contiennent le plasmide muté.

La PCR est réalisée avec 125 ng de chaque amorce sens et antisens, 50 ng de plasmide pNTBac-gp120, 1 µL de dNTP mix, 5 µL de tampon 10X et 2,5 U de PfuUltra High-Fidelity DNA polymerase (qsp 50 µL H₂O).

Le mélange réactionnel est soumis à une dénaturation à 95°C pendant 8 min avant d'ajouter le mélange de dNTP et l'enzyme. L'amplification est conduite pendant 18 cycles de 30 s à 95°C, 1 min à 55°C et 12 min à 68°C (2 min/kb de plasmide), suivis d'une élongation finale de 15 min à 68°C. Suite à l'amplification, les plasmides parentaux (méthylés car provenant d'une amplification par bactéries) sont éliminés par digestion du mélange pendant 1 h à 37°C avec 1 µL de DpnI (Roche), spécifique de l'ADN méthylé. Des bactéries TOP10 ultracompetentes sont ensuite transformées avec le produit de PCR digéré (cf I-2.2.). Dix colonies sont piquées et inoculées dans 5 mL de LB – ampicilline (50 µg/mL) et incubées une nuit à 37°C, sous agitation. L'ADN plasmidique est purifié (« Wizard Plus SV Miniprep » - Promega). Pour vérifier les mutations, l'ADN purifié correspondant à chacune des 10 colonies est digéré par l'enzyme de restriction adéquate (2 µL d'ADN, 1 µL de tampon approprié pour

l'enzyme, 0,5 μL d'enzyme, qsp 10 μL H_2O) 1 h à 37°C. Les produits digérés sont séparés sur gel d'agarose 1%.

V- PURIFICATION DES PROTEINES

Grâce à la séquence signal de la melittine, située en amont du gène codant pour gp120, la protéine gp120 est sécrétée dans le milieu de culture. A l'issue de l'infection, le milieu brut est prélevé et purifié par différentes méthodes de chromatographie successives. Toutes les étapes de purification sont réalisées à 4°C, en utilisant un système FPLC ÄKTA Basic (Amersham Biosciences). Des antiprotéases sont ajoutées au milieu brut puis à chaque étape de purification.

V-1. Séparation sur colonne échangeuse de cations : SP sépharose

La première étape de purification consiste à purifier le milieu de culture sur une colonne échangeuse de cations, en utilisant une résine SP sépharose (Amersham Biosciences). Les groupes sulfopropyl (SP, pI = 1) sont des groupements acides chargés négativement à un pH supérieur à 1. Ils retiennent donc les protéines chargées positivement (dont le pI est supérieur au pH du tampon d'élution utilisé). Le milieu de culture contenant gp120 (pI=10) est chargé sur une colonne SP sépharose, préalablement équilibrée avec du tampon 50 mM HEPES pH 8,2. Après lavage de la colonne avec 5 volumes de tampon HEPES et 5 volumes de tampon HEPES additionné de 0,3% P20 (détergent BIAcore), la protéine gp120 est éluée par application d'un gradient de sel variant de 0 à 0,5 M NaCl, à 2 mL/min pendant 25 mL, suivi d'un palier de 10 mL à 0,5 M NaCl et, enfin, d'un second gradient de sel variant de 0,5 à 1 M NaCl, à 2 mL/min pendant 4 mL.

Des fractions de 2 mL sont récoltées et celles correspondant au pic d'absorbance à 280 nm sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Les fractions contenant gp120 sont réunies et injectées sur une colonne d'affinité.

V-2. Séparation sur colonne d'affinité : lentil-lectine

La deuxième étape de purification fait appel à une chromatographie d'affinité, basée sur l'affinité des lectines pour les protéines glycosylées. La colonne de lentil-lectine (environ 4 mL de résine) est équilibrée avec du PBS à 1 mL/min. Après injection de l'échantillon purifié sur résine SP sépharose, la colonne de lentil-lectine est lavée avec du tampon PBS jusqu'au retour de l'Abs 280 nm à zéro. L'élution est réalisée par passage d'une solution de

PBS 1 M méthylmannopyranoside également jusqu'au retour de l'Abs 280 nm à zéro. Des fractions de 0,5 mL sont récoltées et celles correspondant au pic d'absorbance à 280 nm sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Les fractions contenant gp120 sont réunies et déssalées, puis concentrées (cf IV-4.).

V-3. Séparation par chromatographie d'exclusion : Superdex 200

L'échantillon concentré, issu de la purification sur résine de lentil-lectine, est injecté sur une colonne d'exclusion (Superdex 200 - Amersham Biosciences), préalablement équilibrée dans du PBS, à 0,4 mL/min. Des fractions de 0,5 mL sont récoltées et analysées par électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes ; celles contenant gp120 sont réunies et concentrées (cf IV-4.).

V-4. Déssalage, concentration et dosage des protéines

Les échantillons sont changés de tampon (de 1 M à 0.05 M méthylmannopyranoside) en diluant l'échantillon dans du PBS. La concentration s'effectue dans une cellule Amicon de 10 mL avec une membrane possédant un seuil de coupure de 30 kDa (Millipore), jusqu'à un volume de 1 mL. Une deuxième étape de concentration permet de concentrer des petits volumes. L'échantillon de 1 mL est transféré dans un microcon (10 kDa - Millipore) et concentré jusqu'à un volume d'environ 250 µL. Les protéines purifiées sont additionnées d'antiprotéases, quantifiées et stockées à -20°C. Elles sont également dosées et analysées grâce à un analyseur de type « Biochrom 30 ».

VI- PREPARATION DE BANQUES D'OLIGOSACCHARIDES

VI-1. Digestion enzymatique de l'héparine

De l'héparine (10 g - Sigma) issue de muqueuses de porc est dépolymérisée avec de l'héparinase I (8 milliunités/mL - Grampian Enzymes) dans du tampon 5 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, pH 7,5 et 0,1 mg/mL BSA, pendant 54 h à 25°C. La digestion enzymatique est suivie par mesure de l'absorbance à 232 nm, puis stoppée en chauffant le mélange réactionnel, pendant 5 min à 100°C.

VI-2. Purification des oligosaccharides

Les produits de digestion sont séparés selon leur taille sur une colonne Bio-Gel P10 (4,4 x 150 cm - Biorad), équilibrée avec 0,25 M NaCl, à un débit de 1 mL/min. Le matériel élué est détecté par une lecture de l'absorbance à 232 nm. Cette étape permet d'obtenir des échantillons d'oligosaccharides de taille uniforme, du disaccharide (dp2) à l'octadécasaccharide (dp18). Pour s'assurer de leur homogénéité, seules les fractions de la pointe de chaque pic sont conservées et réunies. Ces fractions sont à nouveau purifiées sur une colonne de gel filtration pour éliminer les contaminants éventuels. Puis les échantillons sont dialysés contre de l'eau et quantifiés par un dosage colorimétrique, basé sur la méthode de Bitter et Muir⁸⁰¹.

VII- ETUDE DE L'INTERACTION GP120/HEPARINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Une colonne d'héparine (TSKgel Heparin-5PW, Tosoh Bioscience), montée sur un système HPLC, est équilibrée dans du tampon HEPES 50 mM pH 7,4 à un débit de 1 mL/min. Après injection de 50 µg de protéine gp120, la colonne est rincée pendant 10 min avec le tampon HEPES, puis un gradient de sel (0 à 1 M en 20 min) est appliqué afin d'éluer gp120. Des fractions de 500 µL sont récoltées. L'absorbance est lue à 232 nm. Tous les mutants sont successivement injectés sur la colonne et leurs profils d'élution sont comparés.

Les fractions correspondant aux pics d'élution sont analysées par Dot-Blot. Après lavage de la membrane de nitrocellulose (Biorad) deux fois avec 200 µL de TBS, 100 µL de chaque fraction sont déposés sur la membrane. La membrane est à nouveau rincée deux fois avec 200 µL de TBS, puis la protéine gp120 est détectée de la même façon que pour la technique du Western Blot (cf I-4.2.).

VIII- BIACORE

VIII-1. Fonctionnalisation des surfaces

Les *sensorchips* utilisées sont de type CM4, c'est-à-dire recouvertes d'une couche de dextran à faible densité d'acides carboxyliques. Le tampon utilisé est de l'HBS-P (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005% v/v détergent P20). Une *sensorchip* possède 4 pistes,

⁸⁰¹ Bitter, T. and Muir, H. M. (1962) *Anal Biochem* **4**, 330-334

qui sont fonctionnalisées comme suit : 1) surface de contrôle négatif, 2) surface d'héparine biotinylée, 3) surface CD4 et 4) surface 17b.

Les acides carboxyliques du dextran sont activés, sous la forme d'esters de succinimide, par injection de 50 μ L de 0,2 M N-éthyl-N'-(diéthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) et 0,05 M N-hydroxy-succinimide (NHS) à 5 μ L/min, sur les quatre surfaces. De la streptavidine (100 μ g/mL dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH 4,5) est ensuite immobilisée par ses amines primaires, sur les pistes 1 et 2. Les groupes carboxyliques activés non occupés par la streptavidine sont bloqués avec 50 μ L d'éthanolamine 1 M, pH 8,5. La piste 1 ainsi réalisée constitue une surface de contrôle négatif. Sur la piste 2, de l'héparine de 6 kDa biotinylée est injectée (5 μ g/mL dans de l'HBS-P 0,3 M NaCl) à 5 μ L/min, de façon à immobiliser 15 à 20 RU (*Resonance Units*) de polysaccharides. Sur les pistes 3 et 4, les ligands sont injectés directement sur la surface activée. Ils vont se fixer, par leurs amines primaires, au dextran activé. Des molécules de CD4 (Progenics Pharmaceuticals - 5 μ g/mL dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH 4,5) sont injectées sur la piste 3, à un débit de 5 μ L/min, pour fixer environ 650 RU de protéines. Sur la piste 4, l'anticorps anti-CD4i 17b (5 μ g/mL dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH 4,5) est injecté, à 5 μ L/min, afin d'immobiliser environ 800 RU. Enfin, sur ces deux pistes, les groupes carboxyliques activés non occupés sont ensuite bloqués avec 50 μ L d'éthanolamine 1 M, pH 8,5.

VIII-2. Tests d'interaction

Les tests d'interaction sont réalisés avec le BIAcore 3000, à 25°C, à un débit de 10 μ L/min, dans du tampon HBS-P. Les échantillons à analyser (gp120, préincubée ou non avec CD4 et/ou des oligosaccharides) sont injectés simultanément sur les 4 surfaces. Les surfaces sont régénérées avec 10 μ L d'HCl 10 mM puis 25 μ L de NaCl 2 M. Les études cinétiques sont réalisées en injectant gp120 ou gp120/CD4 à différentes concentrations, pendant 25 min (pour que la phase d'association parvienne à l'équilibre), à un débit de 10 μ L/min. les sensorgrammes obtenus sont analysés avec le logiciel BIAevaluation 3.0.

IX- ETUDE DE L'INTERACTION GP120/CXCR4

IX-1. Analyses par cytométrie en flux

Des cellules CEM (5.10^5 cellules par échantillon), exprimant CXCR4, sont rincées 3 fois dans du tampon PBS, 1% BSA, 0,02% azide, 1 mM EDTA (tampon FACS) et

centrifugées 5 min à 3200 rpm à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées, pendant 1 h à 4°C, avec SDF-1 α à différentes concentrations (0 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 2 μ M, 4 μ M) ou avec un complexe gp120/CD4 (2/2 μ M) au préalable incubé 1 h à température ambiante. Les incubations sont réalisées dans un volume final de 50 μ L et les protéines sont diluées dans le tampon FACS. L'expérience est réalisée à 4°C et en présence d'azide, afin d'éviter l'internalisation du récepteur.

Après 1 h d'incubation, l'anticorps 12G5 couplé à la FITC (R&D Systems), dirigé contre CXCR4, est ajouté dans chaque tube, à une concentration finale de 2 μ g/mL, pendant 1 h à 4°C. Un témoin positif (cellules incubées avec 12G5-FITC) permet de déterminer l'expression maximale de CXCR4. Les cellules sont rincées 3 fois dans le tampon FACS puis la fluorescence est analysée sur 20000 évènements, par cytométrie en flux sur un FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, Mountain View, CA - CELL Quest software).

IX-2. Etude de la mobilisation du calcium intracellulaire dans un système cellulaire CXCR4+

Les cellules CHO CXCR4-A2, exprimant de façon constitutive CXCR4, l'apoaéguorine mitochondriale et la protéine G α_{16} (Euroscreen) sont cultivées à 37°C (5% CO₂), dans du milieu F12 additionné de 10% SVF, 400 μ g/mL de généticine, 100 U/mL de pénicilline, 100 μ g/mL de streptomycine et 250 μ g/mL de Zéocine (Invitrogen).

Les cellules sont rincées dans du PBS, décollées avec du PBS-EDTA 5 mM, centrifugées et resuspendues à une concentration de 10⁷ cellules/mL, dans du milieu Optimem - 0,1 mM CaCl₂, préchauffé à 37°C et additionné de coelenterazine h (Interchim) à 5 μ M final. Les cellules sont incubées pendant 2h30, à 37°C, à l'obscurité. Au bout d'1 h, les HS cellulaires sont dégradés en ajoutant les héparinases I et III (Grampian Enzymes), à 100 mU/mL final. Les cellules sont ensuite diluées à 10⁶ cellules/mL. La dégradation des HS est vérifiée par cytométrie en flux : 10⁵ cellules, traitées ou non aux héparinases, sont prélevées, rincées 3 fois avec le tampon FACS (cf VII-1.) et incubées avec l'anticorps 10E4 (10 μ g/mL final), dirigé contre les HS, pendant 1h à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées et incubées avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la FITC (1/300), pendant 1h, à 4°C. Les cellules sont enfin rincées 3 fois dans le tampon FACS, puis la fluorescence est analysée sur 20000 évènements, par cytométrie en flux.

Pour vérifier la charge des cellules en coelenterazine, 50 µL de milieu Optimem sont déposés dans une plaque 96 puits. La luminescence est mesurée sur un luminomètre équipé d'un injecteur (Mithras), à 37°C, pendant 20 s, puis $5 \cdot 10^4$ cellules (dans 50 µL) sont injectées et la luminescence est à nouveau mesurée pendant 20 s. Enfin, 50 µL de digitonine (50 µM final) sont injectés pour casser les cellules et le pic de luminescence est mesuré pendant 15 s.

Une gamme de la chimiokine SDF-1α (200 nM, 600 nM et 2 µM dans du milieu Optimem préchauffé à 37°C) ou du complexe gp120/CD4 (0,2/2 µM à 2/2 µM - préincubé 1h) est réalisée ; 50µL de chaque dilution sont déposés dans une plaque 96 puits. La luminescence à 466 nm est mesurée pendant 20 s avant l'injection des cellules, puis pendant 20 s supplémentaires après injection de $5 \cdot 10^4$ cellules (50 µL).

IX-3. Chimiotaxie des cellules A3.01

Des cellules A3.01 (Lymphocytes T ; CD4+ ; CXCR4+ ; HS-) sont resuspendues dans du milieu RPMI 20mM HEPES, 1% sérum humain, à une concentration de $1,3 \cdot 10^6$ cellules/mL (10^5 cellules par puits) et incubées pendant 30 min à 37°C.

L'expérience de chimiotaxie est réalisée dans des plaques Transwell 96 puits, avec une porosité de 5 µm (Corning). Dans la chambre inférieure, 235 µL de milieu RPMI 20 mM HEPES, 1% sérum humain supplémenté ou non en ligand (SDF-1α : 0,3 nM à 30 nM ou gp120/mini-CD4 : 0,2 nM/200 nM à 200 nM/200 nM) sont déposés. 10^5 cellules (75 µL) sont déposées dans chaque chambre supérieure et le tout est incubé 3 h à 37°C. Le mini-CD4 (obtenu par F. Baleux, Institut Pasteur, Paris) est un peptide synthétique correspondant à une partie du domaine D1 de CD4 de 3 kDa, portant le domaine de fixation à gp120.

Le milieu de la chambre inférieure est ensuite récupéré et analysé par cytométrie en flux pour calculer le nombre de cellules ayant migré. Le dénombrement est limité à la population de cellules homogènes ; les débris cellulaires ne sont pas comptés.

Pour chaque expérience, on réalise un point sans membrane, soit 10^5 cellules dans 310 µL de milieu (*Input* = nombre total de cellules), et un point sans ligand dans la chambre inférieure pour calculer la migration spontanée (MS) des cellules.

Le pourcentage de migration est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ migration} = [(\text{nb cellules migrant en présence du ligand} - \text{MS}) / \text{Input}] \times 100$$

X- ETUDE DES DOMAINES PROTEIQUES DE FIXATION A L'HEPARINE PAR LA TECHNIQUE DES BILLES

X-1. Méthode

Vingt-cinq microlitres de billes d'héparine (TSK gel heparin 5PW – Tosoh Bioscience) sont resuspendues dans du PBS. Les groupes carboxyliques de l'héparine sont activés avec 3 mM d'EDC et 7,5 mM de NHS pendant 15 min à température ambiante. Les réactifs en excès sont inactivés par addition de β -mercaptoéthanol (15 mM final) et éliminés par centrifugation et lavage des billes avec du PBS. La protéine à analyser (0,3 à 10 μ M) est incubée avec les billes d'héparine activées dans 200 μ L de PBS, pendant 2 h, à température ambiante, sous agitation. La glycoprotéine d'enveloppe du virus de la pseudorabie gC est étudiée à différentes concentrations : 600 nM et 6 μ M. La chimiokine modifiée RANTES (9-68) est étudiée à 300 nM et 10 μ M et le domaine 4/5 de la chaîne α 3 de la laminine à 300 nM.

La réaction est stoppée avec 20 μ L de 1 M Tris pH 6,8, puis les billes sont lavées avec du PBS, 2 M NaCl pour éliminer les protéines fixées de façon non covalente.

Les protéines couplées aux billes d'héparine sont dénaturées dans du PBS, 2 M urée pendant 15 min à 60°C puis resuspendues dans 50 μ L de PBS et digérées une nuit, puis 3 h supplémentaires, avec 53 mIU de thermolysine (Sigma), à 60°C, sous agitation. Les peptides relargués sont éliminés par centrifugation et lavage des billes dans du PBS, 2 M NaCl, 15 mM β -mercaptoéthanol, 1% Triton. Les billes sont ensuite rincées dans l'eau et déposées sur un filtre Biobrane. Une membrane Durapore de 5 μ m d'épaisseur est ajoutée sous le filtre pour empêcher les billes de s'infiltrer dans le système. Le séquençage N-terminal des peptides retenus sur l'héparine est réalisé par la technique d'Edman, grâce à un séquenceur en phase gazeuse (Applied Biosystems 492A).

X-2. Alternative: interaction protéine/héparine en solution

Une alternative à la méthode des billes consiste à s'affranchir des billes et à réaliser l'expérience en solution. Une fraction de l'héparine est biotinylée afin de détecter l'héparine et les complexes héparine-protéine. Certaines expériences sont réalisées en remplaçant l'héparine par un dodécasaccharide (dp12).

Biotinylation de l'héparine

Dix microlitres (1 mg) d'héparine de 15 kDa (resp. dp12) sont incubés avec 10 µL de biotine 100 mM préparée dans du DMSO (EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin - Pierce) et 80 µL de PBS, pendant 48 h, à température ambiante. L'échantillon est ensuite déssalé sur une colonne Pd10 (Amersham Biosciences), dans du PBS, et stocké à -20°C à une concentration de 10 mg/mL.

Activation des groupes carboxyliques de l'héparine

Cent cinquante microgrammes d'héparine de 15 kDa (Sigma) et 50 µg d'héparine de 15 kDa biotinylée (resp. dp12 et dp12 biotinylé) sont séchés et resuspendus dans 43 µL d'une solution d'EDC (6 mM)/NHS (15 mM), préparée dans du PBS. L'activation est réalisée pendant 12 min, puis les réactifs en excès sont inactivés par addition d'une solution de β-mercaptoéthanol à 1% (20 mM final), pendant 15 min.

Interaction Hp/protéine

La protéine à analyser est incubée avec l'héparine ou le dp12 activés, en excès molaire d'environ 3 à 10 fois, selon les conditions décrites dans le tableau IX. Dans un premier temps, la méthode est validée avec RANTES (9-68), puis appliquée à gp120, seule ou préincubée pendant 1 h à température ambiante avec CD4.

Protéine	Héparine ou dp12 activés	Volume réactionnel
RANTES (9-68) 300 nM	5,4 µM	500 µL
RANTES (9-68) 3 µM	27 µM	100 µL
RANTES (9-68) 10 µM	27 µM	100 µL
gp120 3,5 µM	35 µM	100 µL
gp120 500 nM	5 µM	700 µL
gp120/CD4 3,5/3,5 µM	35 µM	100 µL

Tableau IX: récapitulatif des conditions expérimentales utilisées

Le mélange est incubé 2 h à température ambiante, puis les acides carboxyliques n'ayant pas réagi sont bloqués avec une solution de Tris 100 mM final. L'interaction polysaccharide/protéine est vérifiée par analyse du complexe en Western Blot.

Digestion et purification des complexes

Les protéines sont ensuite digérées avec 53 mIU de thermolysine (Sigma), à 50°C, pendant 5 h, puis pendant une nuit, dans les mêmes conditions.

Les fragments protéiques n'interagissant pas avec l'héparine sont éliminés par

purification de l'échantillon sur une résine échangeuse d'anions. Brièvement, la colonne de DEAE (2 mL) est équilibrée dans une solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM pH 6,5, à un débit de 1 mL/min. Après injection de l'échantillon, la colonne est lavée avec 5 à 10 volumes de 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5, puis avec 5 à 10 volumes de 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5 NaCl 0,3 M. Ces étapes permettent d'éliminer les peptides fixés de façon non spécifique à l'héparine et/ou à la résine. Enfin, les complexes héparine/peptides sont élués dans une solution de 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5 NaCl 1 M. L'absorbance est mesurée à 232 nm et 280 nm en parallèle et des fractions de 1 mL sont récoltées. Les fractions contenant les complexes héparine/peptides sont réunies, déssalées sur Pd10 et concentrées à un volume inférieur à 100 μL et les peptides retenus sur l'héparine sont séquencés par la technique d'Edman.

Cette méthode est mise au point avec RANTES (9-68). L'élution des complexes héparine/protéine est, dans un premier temps, vérifiée sans digestion préalable par la thermolysine. Après activation de l'héparine, RANTES (9-68) (10 μM) est incubée pendant 2 h, puis l'échantillon est directement injecté sur la colonne de DEAE. La purification est réalisée comme décrit ci-dessus et les fractions sont analysées par Dot-Blot (cf VI) dans trois conditions différentes :

- dépôt des fractions (200 μL) sur une membrane Zetaprobe (Biorad) et révélation de l'héparine biotinylée
- dépôt des fractions (200 μL) sur une membrane de nitrocellulose (Biorad) et révélation de l'héparine biotinylée. Dans ce cas, seuls les complexes héparine/protéine sont visibles puisque l'héparine non complexée n'est pas retenue par la membrane.
- dépôt des fractions (300 μL) sur une membrane de nitrocellulose (Biorad) et révélation de RANTES (9-68).

Après saturation des membranes en protéines (cf I-4.2.), l'héparine biotinylée est révélée avec de l'extravidine-HRP au 1/7000 (Sigma) dans du TBS-tween 20. La protéine RANTES (9-68) est révélée par incubation de la membrane pendant 1 h, dans une solution de TBS - tween 20 - 5 % lait écrémé, contenant un anticorps de chèvre dirigé contre RANTES (R&D – 1/1000) puis un anticorps secondaire-HRP dirigé contre les IgG de chèvre (Jackson Immunoresearch – 1/5000).

RESULTATS ET DISCUSSION

I- PRODUCTION ET PURIFICATION DE GP120 ET DE SES FORMES MUTANTES EN CELLULES D'INSECTES

Les systèmes d'expression basés sur la transfection de cellules d'insectes sont intéressants dans la mesure où ces cellules sont des organismes eucaryotes supérieurs, capables d'effectuer la plupart des modifications post-traductionnelles requises pour la stabilité et la fonctionnalité des protéines surexprimées. Par ailleurs, les cellules d'insectes sont aisées à manipuler puisqu'elles sont semi-adhérentes, c'est-à-dire qu'elles ont la faculté de pousser soit en plaques soit en suspension sous agitation, ce qui constitue un avantage majeur pour la production à grande échelle. Enfin, elles se multiplient à température ambiante (de 23 à 27°C), et n'exigent pas d'équipements particuliers, puisqu'elles se développent sans CO₂.

Deux systèmes d'expression de gp120 ont été développés en parallèle : l'un basé sur la transfection de cellules de drosophiles S2 avec un plasmide possédant le gène codant pour gp120 et l'autre sur l'infection de cellules Sf21 par un baculovirus recombinant. Des travaux précédents ont décrit l'expression de gp120 dans chacun de ces systèmes^{802,803}. La comparaison de ces systèmes d'expression est détaillée dans la partie « discussion ».

I-1. Production de gp120 en cellules S2 de drosophiles

Les cellules S2 dérivent de cultures primaires d'embryons de *Drosophila melanogaster*⁸⁰⁴. Elles présentent plusieurs avantages : elles sont notamment capables d'atteindre des densités cellulaires 10 fois plus élevées que d'autres cellules d'insectes (de l'ordre de 3.10⁷ cellules/mL de culture sous agitation simple et jusqu'à 4.10⁷ en bioréacteur), ce qui constitue un avantage dans le cadre d'une production à grande échelle.

Le système d'expression en cellules de drosophiles présente l'avantage de contrôler le moment où la protéine va être produite, *via* un promoteur inductible, et de sécréter la protéine dans le milieu de culture (grâce à la séquence signal d'excrétion BiP), afin de faciliter sa purification.

I-1.1. Conception du plasmide pMT/BiP/V5/HisA-gp120

Le fragment correspondant au gène codant pour gp120 déléte de sa séquence signal est

⁸⁰² Culp, J. S., Johansen, H., Hellmig, B., Beck, J., Matthews, T. J., Delers, A. and Rosenberg, M. (1991) *Biotechnology (N Y)* **9** (2), 173-177

⁸⁰³ Murphy, C. I., McIntire, J. R., Davis, D. R., Hodgdon, H., Seals, J. R. and Young, E. (1993) *Protein Expr Purif* **4** (5), 349-357

⁸⁰⁴ Schneider, I. (1972) *J Embryol Exp Morphol* **27** (2), 353-365

amplifié par PCR, inséré dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO, isolé par une double coupure BamHI/XhoI, puis inséré dans le vecteur pMT/BiP/V5/HisA linéarisé par une coupure BglII/XhoI. L'ADN des clones positifs subit une coupure par PstI afin de vérifier la présence de l'insert (figure 34). L'enzyme PstI ne coupe pas dans la séquence codant pour gp120 et coupe le plasmide pMT/BiP/V5/HisA à 3 reprises : à 459 pb, 956 pb (ce site disparaît puisque gp120 est cloné entre les sites BglII (906 pb) et XhoI (980 pb) et 1397 pb.

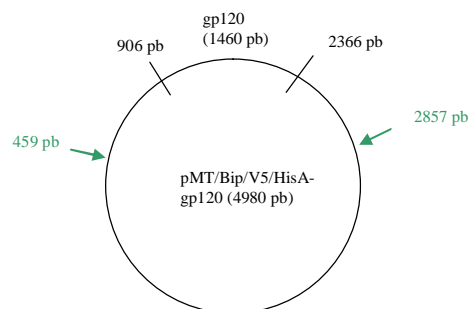


Figure 34 : carte de restriction par PstI du plasmide pMT/BiP/V5/HisA-gp120

L'enzyme PstI coupe pMT/BiP/V5/HisA-gp120 au niveau de deux sites (à 459 pb et à 2857 pb) générant deux fragments de 2582 pb et 2398 pb.

La présence du gène codant pour gp120 est ainsi détectée par la présence de deux fragments de 2582 pb et 2398 pb. Dans le cas contraire, le plasmide vide est coupé en trois parties de 497 pb, 1901 pb et 2582 pb (résultats non présentés). L'ADN correspondant à un clone positif est vérifié par séquençage.

I-1.2. Production

Des cellules S2 de drosophiles sont cotransfectées avec le plasmide pMT/BiP/V5/HisA-gp120 et le plasmide pCoHygro, dans différentes conditions (cf matériel et méthodes I-3.2.). Deux *ratios* « plasmide d'expression/plasmide de sélection » sont testés : 19:1 et 39:1. Après sélection des cellules cotransfectées, en présence d'hygromycine (300 µg/mL), pendant 4 semaines, un test d'induction (1 mM de CuSO₄ final, 72 h), suivi d'une immunodétection par Western Blot, est réalisé sur un tiers des cellules afin de vérifier les quantités optimales d'ADN à transférer pour produire gp120 (figure 35). Les cellules cotransfectées avec un *ratio* « plasmide d'expression/plasmide de sélection » de 39:1 expriment de plus fortes quantités de gp120. Cette condition est donc retenue pour produire gp120.

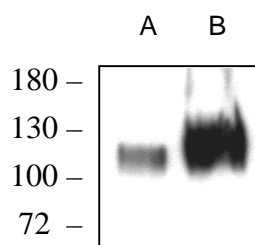


Figure 35 : test d'expression de gp120 dans les cellules S2

Les cellules S2 sont cotransfectées avec le plasmide d'expression pMT/Bip/V5/HisA-gp120 et le plasmide pCoHygro, puis sélectionnées quatre semaines en présence d'hygromycine. Deux *ratios* de vecteur d'expression / vecteur de sélection sont testés : 19 : 1 (A) et 19,5 : 0,5 (B). L'expression de gp120 est ensuite induite (1 mM CuSO₄ final, 72 h) et 100 µL de surnageant de culture sont analysés sur un gel SDS-PAGE 10%, suivi d'un immunoblot. La protéine gp120 est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre gp120 et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche de la figure.

Une induction avec une gamme de concentrations croissantes d'inducteur est réalisée pendant 72 h (temps préconisé dans le protocole Invitrogen) afin de définir la concentration optimale de CuSO₄ (figure 36A). Une cinétique, réalisée à une concentration de CuSO₄ prédéfinie, permet ensuite de déterminer le meilleur temps d'induction (figure 36B). Une induction au CuSO₄ à des concentrations variant entre 0,75 et 2 mM final permet de produire gp120 dans des quantités similaires. Une concentration de 1 mM final de CuSO₄ est retenue pour la suite. Les résultats du test cinétique montrent que le temps d'induction optimal se situe entre 72 et 96 h.



Figure 36 : optimisation des conditions de production de gp120 dans les cellules S2

Des cellules S2 sont cotransfectées de façon stable avec le plasmide d'expression pMT/Bip/V5/HisA-gp120 et le plasmide pCoHygro (19,5 : 0,5). L'expression de gp120 est ensuite induite pendant 72h avec différentes concentrations de CuSO₄ (A), ou pendant un temps variable (24 à 96 h) avec 1mM final de CuSO₄ (B). Des échantillons de 200 µL de surnageant de culture sont analysés sur un gel SDS-PAGE 10% suivi d'un immunoblot. La protéine gp120 est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre gp120 et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche de la figure.

Au vu de ces résultats, l'expression de gp120 est induite pendant 72 h, à une concentration finale de 1 mM de CuSO₄.

Ce système d'expression sera finalement abandonné au profit d'un autre, basé sur l'infection de cellules d'insectes avec des baculovirus recombinants, présentant l'avantage d'augmenter les rendements de production de gp120.

I-2. Production avec le système Bac-to-Bac

Parallèlement à l'expression dans les cellules S2, un deuxième système de production est développé afin de produire gp120 en infectant des cellules d'insectes (Sf9, Mimic Sf9, Sf21 ou HF) avec un baculovirus recombinant, dont le génome (bacmide) possède le gène codant pour gp120. Les différentes constructions plasmidiques réalisées possèdent également une séquence signal de sécrétion (celle d'egt ou de la melittine) en amont du gène codant pour gp120.

L'ecdysteroid UDP-glucosyltransférase (egt) est une enzyme du baculovirus qui facilite la conjugaison des molécules de glucides à l'ecdysone, une hormone stéroïde notamment présente chez les insectes. L'ecdysone joue un rôle important dans le déclenchement et la régulation de la mue des larves, d'un stade larvaire à l'autre. Une fois conjuguée à l'egt, l'hormone est inactive et la mue de la larve est inhibée, prolongeant ainsi le stade larvaire et augmentant la consommation foliaire. La melittine est un peptide toxique contenu dans le venin des abeilles (50% de la matière sèche du venin). Ces deux protéines sont naturellement sécrétées et possèdent donc des séquences signal d'excrétion, testées ici afin de définir celle permettant la meilleure sécrétion de gp120.

I-2.1. Conception des plasmides puis des bacmides recombinants

Deux plasmides, différant par leur site de clonage multiple et leur séquence signal d'excrétion, ont été construits. Le vecteur pFastBac ne possède pas de peptide signal de sécrétion ; la séquence signal d'egt a donc été clonée directement en amont du gène codant pour gp120. Le choix du peptide signal est détaillé dans la partie « discussion ». En revanche, le plasmide pNT-Bac, dérivé de pFastBac, possède la séquence signal de la melittine.

I-2.1.1. pFastBac-gp120

La séquence signal de sécrétion d'egt est trop longue pour être contenue dans une seule amorce. Deux amorces chevauchantes sont donc dessinées et la séquence signal est insérée en amont du gène codant pour gp120 en réalisant deux PCR successives avec chacune des amorces 3'. L'insert obtenu est cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO, isolé par une double coupure XbaI/XhoI et enfin inséré dans le vecteur pFastBac. L'ADN des clones positifs est digéré par XbaI/XhoI, afin de vérifier la présence de l'insert (figure 37). Seule la colonie 15 est négative. L'ADN correspondant à la colonie n°5 est retenu pour générer le bacmide recombinant.

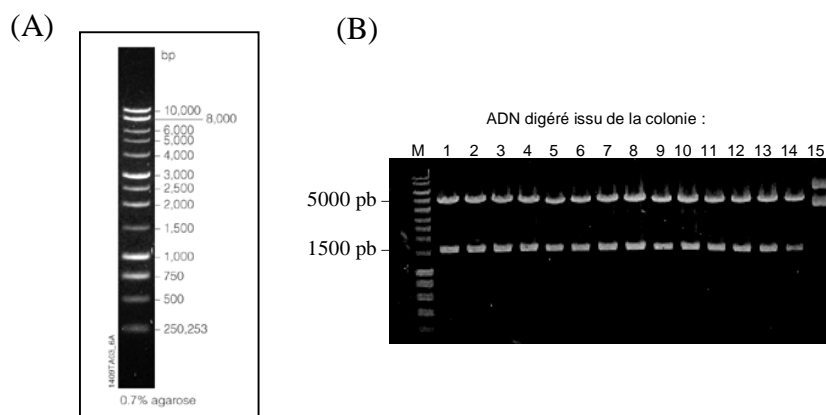


Figure 37 : vérification de la présence du gène codant pour gp120 dans pFastBac

(A) Marqueur de poids moléculaire « 1 kb DNA Ladder » Promega (noté M en B). (B) Quinze colonies ont été sélectionnées et leur ADN, purifié. La digestion par XbaI/XhoI permet de vérifier la présence de l'insert, en isolant un fragment d'environ 1500 pb si le gène codant pour gp120 a été inséré dans le vecteur pFastBac.

Une fois séquencé, cet ADN est transformé dans des bactéries DH10Bac, possédant le génome du baculovirus. Les colonies blanches issues de cette transformation sont repiquées en parallèle sur des boîtes de LB-ampicilline et sur des boîtes « Bac-to-Bac » (cf matériel et méthodes II-3.). L'ADN (bacmide recombinant) de trois colonies positives est amplifié et purifié. La présence, dans le bacmide, du gène codant pour gp120 ainsi que des éléments transposés de pFastBac est détectée par une PCR. Pour les clones positifs, la PCR, réalisée avec des amorces situées de part et d'autre de l'insert, sur le bacmide, génère un fragment de 3700 pb (figure 38). Les trois clones testés sont positifs.

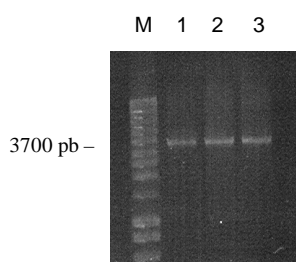


Figure 38 : vérification par PCR de la présence des éléments transposables de pFastBac dans trois bacmides

Trois colonies sensibles à l'ampicilline et blanches sur les boîtes « Bac-to-Bac » sont sélectionnées et leur bacmide, purifié. Une PCR avec les amorces M13 Reverse et M13 Forward est réalisée à partir de ces bacmides purifiés.

I-2.1.2. pNT-Bac-gp120

Un deuxième plasmide a été construit en parallèle : il s'agit de pNT-Bac, construit à partir de pFastBac (annexe I). Ce plasmide possède la séquence signal de la melittine. Le gène codant pour gp120 est cloné immédiatement en aval de cette séquence signal.

Comme pour pFastBac, le gène codant pour gp120 est amplifié par PCR, cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO, isolé par une double coupure BamHI/HindIII et enfin inséré dans le vecteur pNT-Bac. L'ADN des clones positifs subit une coupure par BamHI/HindIII, afin de vérifier la présence de l'insert. L'ADN de l'un des clones positifs est purifié et transformé dans des bactéries DH10Bac pour générer le bacmide recombinant. Une PCR réalisée sur les bacmides purifiés à partir de trois clones positifs permet de vérifier, par la présence d'un fragment de 3700 pb, que le bacmide a bien intégré le gène codant pour gp120 et les éléments transposés de pNT-Bac (résultats non montrés).

1-2.2. Réalisation des plasmides et bacmides mutants

Des données de modélisation moléculaire ont suggéré que quatre acides aminés du site CD4i de gp120 participaient directement à l'interaction avec l'héparine. Nos travaux se sont donc attachés à étudier précisément ces résidus. Une des approches consiste à produire des protéines mutées sur un ou plusieurs de ces acides aminés. Pour cela, les formes mutantes ont été créées à partir du vecteur pNT-Bac contenant le gène sauvage de gp120. Les résultats ci-dessous sont détaillés pour le mutant K421S, tous les mutants ayant été réalisés de façon similaire.

La première étape consiste à réaliser une PCR avec des amorces complémentaires entre elles et possédant la/les mutation(s) souhaitée(s) ainsi qu'un site de restriction créé pour faciliter la détection des clones positifs (site PstI pour le mutant K421S). Le produit PCR ainsi obtenu est digéré par la DpnI, spécifique de l'ADN méthylé, afin de dégrader les brins parentaux, puis inséré par transformation de bactéries Top10. Plusieurs clones sont isolés, leur ADN est purifié et soumis à une digestion par PstI (figure 39). Sur les 8 colonies testées, l'ADN des colonies 1, 2, 3, 4 et 5 possède la mutation K421S. L'ADN correspondant au clone 1 est séquencé.

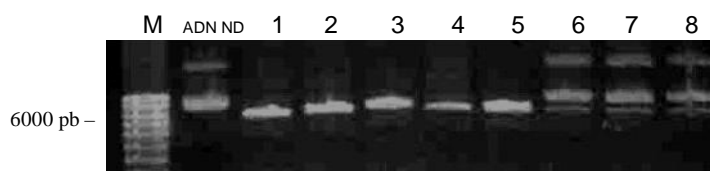


Figure 39 : vérification de la présence de la mutation K421S dans pNT-Bac-gp120

Le plasmide mutant pNT-Bac-gp120-K421S a été réalisé par mutagenèse dirigée. Des bactéries ont été transformées avec les plasmides obtenus. Huit colonies ont été sélectionnées et leur ADN, purifié puis digéré avec PstI, enzyme correspondant au site de restriction créé sur l'amorce en même temps que la mutation K421S. **M** : marqueur de poids moléculaire. **ADN ND** : pNT-Bac-gp120 non digéré.

De la même façon que pour générer le bacmide possédant le gène codant pour la forme sauvage de gp120, des bactéries DH10Bac sont transformées avec l'ADN du clone 1. Une PCR, réalisée sur le bacmide purifié à partir de deux clones positifs, permet de vérifier, par la présence d'un fragment de 3700 pb, que le bacmide a bien intégré le gène codant pour gp120 et les éléments transposés de pNT-Bac (figure 40).

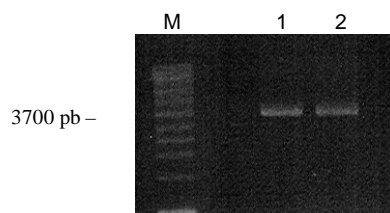


Figure 40 : vérification par PCR de la présence des éléments transposables de pNT-Bac dans deux bacmides

Deux colonies sensibles à l'ampicilline et blanches sur les boîtes « Bac-to-Bac » sont sélectionnées et leur bacmide, purifié. Une PCR avec les amorces M13 Reverse et M13 Forward est réalisée à partir de ces bacmides purifiés.

Les autres bacmides recombinants, contenant les gènes codant pour les protéines gp120 mutées, ont été créés de façon similaire. Sept bacmides mutants ont ainsi été réalisés : ils contiennent le gène codant pour gp120-K121S, gp120-R419S, gp120-K421S, gp120-K432S, gp120-R419S-K421S (également appelé gp120 2M, pour plus de clarté), gp120-K121S-R419S-K421S (ou gp120 3M) ou gp120-K121S-R419S-K421S-K432S (ou gp120 4M).

I-2.3. Choix du type cellulaire et du plasmide le mieux adapté

Les bacmides recombinants possédant les formes sauvage ou mutées de gp120 sont purifiés et utilisés pour transfecter des cellules d'insectes Sf21 afin de générer un stock viral P0. A partir de ce stock viral, des cellules Sf21 sont infectées en plus grande quantité pour générer un stock viral P1 plus important et plus concentré en virus. Ce stock P1 permet d'infecter des cellules avec une MOI de 8 (cf matériel et méthodes II-4.4.) afin de produire gp120. Les conditions de production sont, dans un premier temps, optimisées avec la forme sauvage de gp120. Deux bacmides ont, en effet, été créés à partir des plasmides pFastbac-gp120 et pNT-Bac-gp120 : ces bacmides diffèrent essentiellement par l'origine du peptide signal : egt pour le premier et la melittine pour le second. Par ailleurs, différents types cellulaires peuvent être infectés pour produire la protéine ; quatre types ont été testés pour définir les meilleures conditions de production, au niveau des quantités produites et du niveau de glycosylation.

I-2.3.1. Choix du bacmide

Classiquement, au laboratoire, les productions de protéines sont réalisées dans des cellules HF (HighFive ou Hi5). La production à partir des deux types de bacmides a donc été réalisée à partir de ces cellules.

Des stocks viraux, réalisés à partir de cellules transfectées avec les bacmides issus de pFastBac-gp120 et pNT-Bac-gp120, sont utilisés pour infecter des cellules HF. Une cinétique d'infection est réalisée dans les deux cas, afin de définir le temps optimal d'infection (figure 41). Trente microlitres de surnageant de culture sont analysés par Western Blot. Dès 24 h d'infection, la protéine gp120 commence à être sécrétée, quel que soit le peptide signal (signal un peu plus marqué avec le peptide signal de la melittine). Dans les deux cas, le temps optimal d'infection est défini à 72 h. A 96 h, la protéine semble commencer à se dégrader, en particulier pour la protéine produite avec le peptide signal de la melittine (figure 41B) : une bande immunoréactive apparaît à une taille de 60 kDa.

Aucune différence notable n'est remarquée entre la production de gp120 à partir du plasmide pFastBac (contenant la séquence signal d'egt) et du plasmide pNT-Bac (possédant le peptide signal de la melittine). La production de gp120 est donc poursuivie, de façon arbitraire, en infectant les cellules avec des baculovirus melittine-gp120.

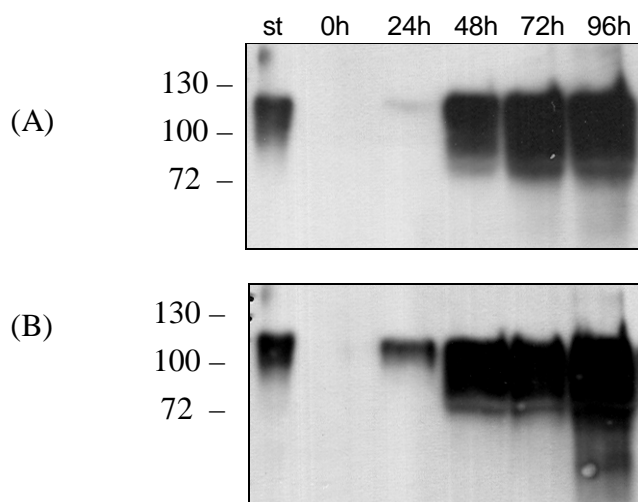


Figure 41 : test cinétique d'expression de gp120 dans des cellules HF

Des cellules HF ($1,75 \cdot 10^7$ cellules) ont été infectées avec 5 mL de baculovirus egt-gp120 sauvage (A) ou de baculovirus melittine-gp120 sauvage (B). Des échantillons (1 mL) sont prélevés toutes les 24 h après l'infection et des aliquots de 30 μ L sont analysés sur un gel SDS-PAGE 10%, suivi d'un immunoblot. La protéine gp120 est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre gp120 et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche de la figure. Le 1^{er} puits (st) contient l'équivalent de 100 ng de gp120.

I-2.3.2. Choix du type cellulaire

La production de gp120 à partir de cellules HF infectées conduit à une protéine qui présente un profil de migration hétérogène (figure 42). La protéine gp120 produite et purifiée, analysée sur gel SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie, présente, en effet, une masse moléculaire variant entre 65 kDa et 120 kDa. Une fois traitée à la N-glycosidase, gp120 présente un poids moléculaire homogène d'environ 60 kDa, correspondant à la partie protéique, déglycosylée, de gp120. La protéine gp120 possède, en effet, en moyenne 25 sites de N-glycosylations, ces glycosylations représentant plus de 50% de la masse totale de la protéine⁸⁰⁵ (cf bibliographie II-1.2.3.). Ces résultats laissent penser que les glycosylations de gp120 réalisées par les cellules HF sont incomplètes et hétérogènes ; ceci paraît surprenant car les HF sont généralement choisies pour la production de protéines glycosylées.

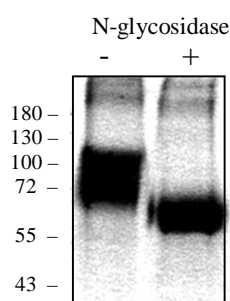


Figure 42 : vérification des glycosylations de gp120 produite en cellules d'insectes

Dix microgrammes de la protéine gp120 produite en cellules d'insectes ont été traités (+) ou non (-) par 1U de N-glycosidase, une nuit à 37°C, puis analysés sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués à gauche de la figure.

La production de gp120 à partir de l'infection d'autres cellules d'insectes est alors testée, afin de déterminer si le profil de glycosylation est plus homogène. Quatre types cellulaires (Sf21, Sf9, Mimic Sf9 et HF) sont infectés avec le stock viral réalisé à partir de cellules transfectées avec le bacmide melittine-gp120 sauvage. Une cinétique d'infection est réalisée entre 0 h et 120 h (figure 43). La quantité de protéines produite par les cellules HF est supérieure à celle exprimée dans les trois autres types cellulaires. Néanmoins, le profil de migration homogène suggère une glycosylation plus aboutie pour les protéines produites par les cellules Sf9 ou Sf21. Dans les Sf21, la quantité produite augmente au cours du temps, jusqu'à 120 h, sans signe apparent de dégradation. En revanche, la protéine produite par les cellules Sf9 se dégrade à partir de 96 h d'infection. Les cellules Mimic Sf9, qui sont des Sf9 modifiées pour produire des protéines sialylées (cf discussion), expriment très faiblement gp120 (résultats non présentés).

⁸⁰⁵ Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C. and Detours, V. (2001) *Br Med Bull* **58**, 19-42

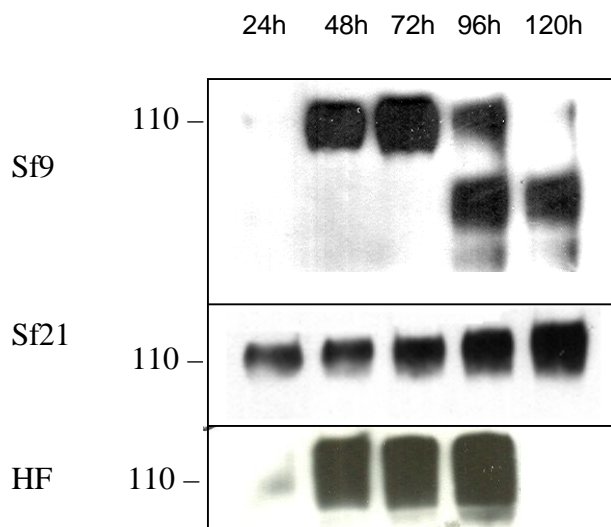


Figure 43 : test cinétique d'expression de gp120 via le système baculovirus, dans différents types cellulaires

Les cellules Sf9, Sf21 ou HF ($1,75 \cdot 10^7$ cellules) sont infectées avec les baculovirus melittine-gp120 sauvage, à une MOI de 8. Des échantillons (1 mL) sont prélevés toutes les 24 h après l'infection et des aliquots (40 μ L pour les cellules Sf9, 50 μ L pour les Sf21 et 20 μ L pour les HF) sont analysés sur un gel SDS-PAGE 10%, suivi d'un immunoblot. La protéine gp120 est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre gp120 et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche de la figure.

NB : pour le test réalisé avec les cellules HF, la cinétique a été stoppée à 96 h, au vu des résultats obtenus précédemment (figure 41).

Au vu de ces résultats, les conditions optimales de production retenues sont donc : une infection de cellules Sf21, pendant 72h, avec un stock viral issu d'une transfection par un bacmide pNT-Bac-gp120. La protéine gp120 est alors sécrétée dans le milieu de culture, grâce à la séquence signal de la melittine.

I-2.4. Titrage des stocks viraux

La forme sauvage ainsi que les formes mutées de gp120 sont produites dans les conditions décrites ci-dessus. Afin d'exprimer ces protéines de manière reproductible, dans des conditions standard, les stocks viraux obtenus après amplification (P1) doivent être titrés.

A partir du titre viral, on peut définir un « taux d'infection » standard, connu sous le nom de MOI (*Multiplicity Of Infection*). Classiquement, les infections sont réalisées à une MOI variant de 1 à 10. Ici, la MOI appliquée a été définie à 8 (c'est-à-dire 8 virus/cellule).

Tous les titres viraux ont été calculés par la méthode des plages de lyse, en infectant des cellules avec différentes dilutions de virus, en les immobilisant avec une couche d'agarose, puis en les colorant avec un colorant vital, 2 à 3 jours après l'infection. De cette

façon, en infectant une cellule, un virus peut se multiplier et infecter les cellules avoisinantes, créant ainsi une plage de lyse non colorée. Ces plages de lyse sont ensuite dénombrées (tableau X).

Stock viral	10^{-6}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}	Moyenne*	Titre viral en pfu/mL
sauvage	16	51	44	ND	85	$8,5 \cdot 10^7$
K121S	6	36	31	ND	42	$4,2 \cdot 10^7$
R419S	10	21	31	ND	51	$5,1 \cdot 10^7$
K421S	5	67	ND	ND	59	$5,9 \cdot 10^7$
K432S	4	39	37	ND	39	$3,9 \cdot 10^7$
R419S-K421S	10	64	68	ND	77	$7,7 \cdot 10^7$
K121S-R419S-K421S	2	5	16	20	11	$1,1 \cdot 10^7$
K121S-R419S-K421S-K432S	4	25	21	ND	29	$2,9 \cdot 10^7$

Tableau X: calcul du titre viral des différents stocks de virus

* moyenne des plages de lyse dénombrables, ramenée à une dilution de 10^{-5} . Pour la dilution 10^{-6} , le nombre de plages comptées est multiplié par 10. ND : non dénombré ; souvent, les plages de lyse sur les boîtes de dilution 10^{-4} sont trop nombreuses pour être comptées.

A partir du titre viral, le volume d'inoculum à ajouter aux cellules est défini pour infecter les cellules à une MOI de 8, dans le but de produire la protéine, ou à une MOI de 0,5 afin d'amplifier le stock viral.

$$\text{Volume d'inoculum} = (\text{MOI} * \text{nombre de cellules}) / \text{titre viral}$$

I-2.5. Production

La culture de cellules en mini-fermenteur permet d'augmenter les volumes de production. Il est néanmoins nécessaire de vérifier, au préalable, que les conditions de production sont identiques pour des cellules infectées en monocouche ou en suspension. Pour cela, deux tests cinétiques sont réalisés en parallèle, avec des cellules cultivées dans une flasque et dans un mini-fermenteur (figure 44). La protéine gp120 produite par des cellules cultivées en monocouche présente des signes de dégradation à partir de 120 h d'infection (apparition de bandes à 70 kDa et 50 kDa environ). En revanche, celle produite en mini-fermenteur semble se dégrader plus rapidement : après 96 h d'infection, la majorité de la protéine est dégradée. Dans les deux conditions, le taux d'expression de la protéine est identique lorsque l'infection dure 72 h.

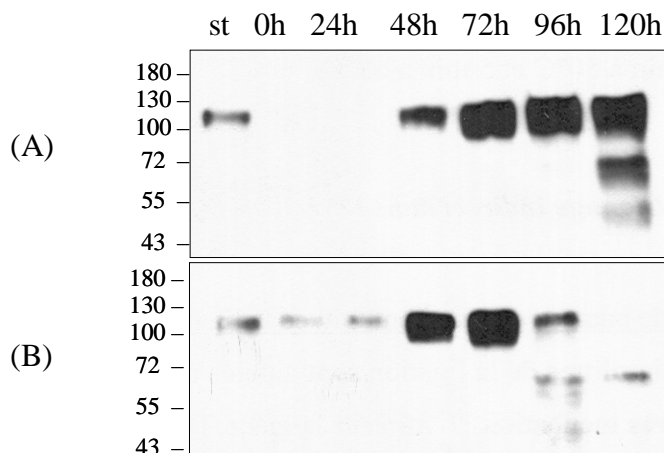


Figure 44 : test cinétique d'expression de gp120 dans des cellules Sf21 cultivées en monocouche ou en suspension

(A) Des cellules Sf21 ($1,75 \cdot 10^7$ cellules) sont cultivées en monocouche (30 mL final) et infectées avec 3 mL de baculovirus melittine-gp120 sauvage. Des échantillons (200 μ L) sont prélevés toutes les 24 h après infection et des aliquots de 40 μ L sont analysés sur un gel SDS-PAGE 10%, suivi d'un immunoblot. La protéine gp120 est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre gp120 et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche de la figure. Le 1^{er} puits (st) contient l'équivalent de 100 ng de gp120. (B) Des cellules Sf21 ($25 \cdot 10^6$ cellules) sont cultivées en suspension dans un mini-fermenteur (50 mL final) et infectées avec 5 mL de baculovirus melittine-gp120 sauvage. L'analyse est réalisée dans les mêmes conditions que (A).

Toutes les productions sont donc réalisées en infectant des cellules cultivées en mini-fermenteur pendant une durée de 72 h, à une MOI de 8. Dans ce cas, les cellules sont adaptées en mini-fermenteur 3 jours avant l'infection puis comptées. Lorsque la quantité de cellules avoisine $5 \cdot 10^8$ cellules, elles sont infectées à une MOI de 8 puis remises en culture à une densité de $0,5 \cdot 10^6$ cellules/mL, pendant 72 h. De cette façon, la protéine gp120 est produite dans un litre de milieu de culture, à un taux estimé à 25-30 mg de gp120 par litre.

I-2.6. Purification

La protéine gp120 est purifiée à partir du surnageant de culture, en trois étapes successives. Les chromatogrammes obtenus au cours des purifications sont présentés pour la forme sauvage de gp120. Toutes les protéines mutées ont été purifiées selon le même protocole.

I-2.6.1. Purification sur résine échangeuse de cations

La première étape de purification consiste à réaliser une chromatographie échangeuse de cations, à pH 8,2. Le surnageant de culture est chargé sur la résine SP sépharose, puis la colonne est lavée avec le tampon de charge en présence de 0,3% P20 (détergent ajouté afin d'éliminer une protéine de baculovirus qui coélue avec gp120 – cf discussion) jusqu'à stabilisation de l'absorbance à 280 nm, afin de décrocher les protéines fixées de façon non

spécifique. Enfin, un gradient de sel permet d'éluer les protéines chargées positivement à pH 8,2, accrochées sur la résine (figure 45). L'absorbance à 280 nm permet de suivre l'élution. Les protéines sont éluées entre 0 et 0,5 M NaCl, avec un maximum d'absorbance à 0,25 M NaCl.

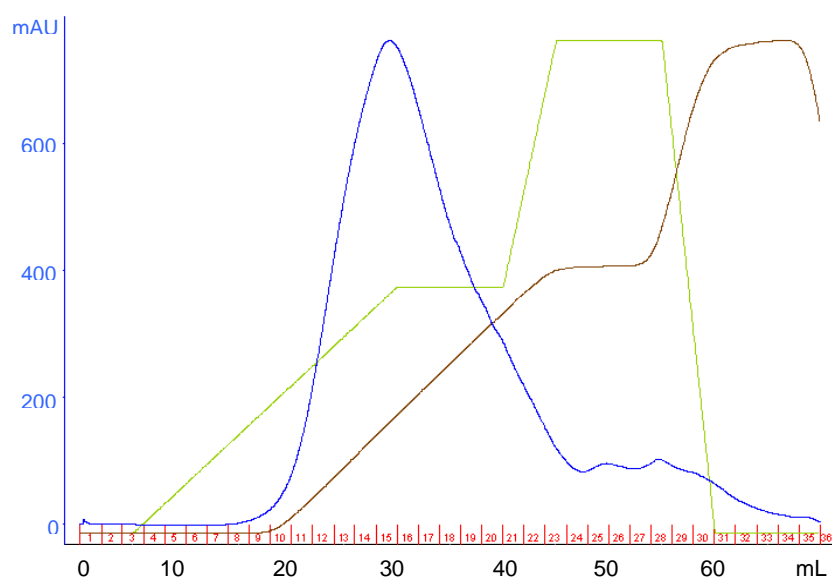


Figure 45 : chromatogramme correspondant à l'étape de purification sur une résine échangeuse de cations

En bleu : absorbance à 280 nm / En vert : gradient théorique/ En marron : conductivité / En rouge : fractions
Après infection pendant 72 h, le surnageant de culture est déposé sur une colonne de SP sépharose. Les protéines fixées de façon non spécifiques sont décrochées par un lavage de la résine avec du tampon 50 mM HEPES pH 8,2, puis avec ce même tampon additionné de 0,3% P20. Les protéines fixées sont ensuite éluées par application de deux gradients de sel successifs. Des fractions de 2 mL sont recueillies.

Vingt microlitres des fractions correspondant au pic d'absorbance sont analysés sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie (figure 46). Les fractions 13 à 20 possèdent la protéine gp120 (bande majoritaire à 110 kDa environ). Les fractions sont également analysées par Western Blot afin de vérifier que la bande visible à 110 kDa correspond bien à gp120 (résultats non présentés). Les fractions contenant gp120 sont réunies et déposées sur une colonne de lentil-lectine.

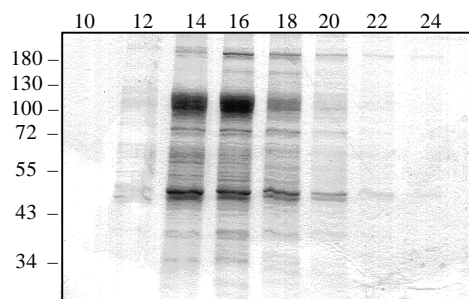


Figure 46 : analyse sur un gel SDS-PAGE des fractions recueillies au cours de l'étape de purification sur la résine échangeuse de cations

Vingt microlitres de chaque fraction, additionnés de 5 μ L de bleu de dépôt 5X, sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10%, coloré au bleu de Coomassie.

I-2.6.2. Purification sur résine d'affinité

La lentil-lectine est une protéine présentant une forte affinité pour les glycoprotéines et les polysaccharides possédant des sucres de type glucose ou mannose. Après passage de l'échantillon, la résine de lentil-lectine est lavée avec du PBS, puis les protéines retenues sont éluées avec du PBS, 1 M Méthylmannopyrannoside. Quarante microlitres des fractions (500 μ L) correspondant au pic d'absorbance à 280 nm sont analysés sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie (figure 47). Les fractions 10 à 18, analysées sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, contiennent gp120. Cette deuxième étape permet d'éliminer certaines protéines « contaminantes » et augmente le degré de pureté de gp120 (Figure 47C).

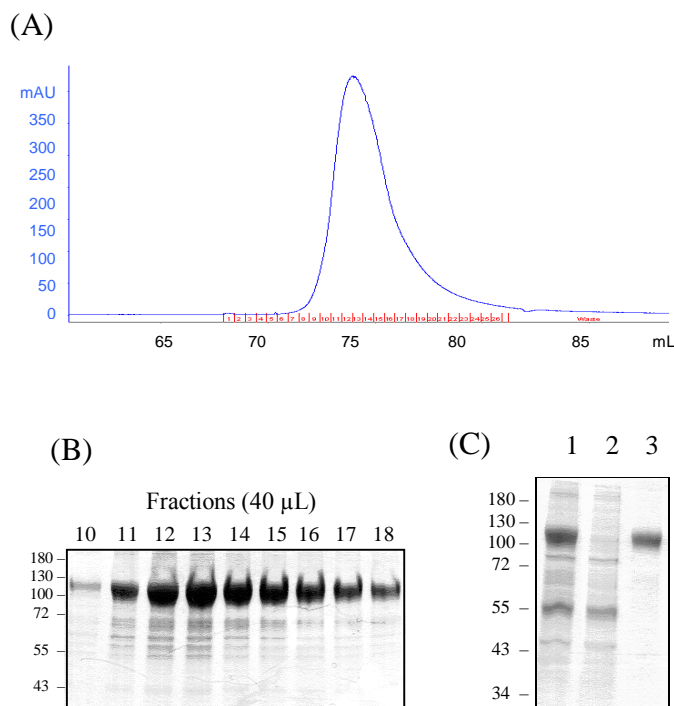


Figure 47 : étape de purification de gp120 sur une résine de lentil-lectine.

(A) Chromatogramme. En bleu : absorbance à 280 nm / En rouge : fractions.

Les fractions sélectionnées suite à l'étape de purification sur colonne échangeuse de cations sont réunies et déposées sur une résine de lentil-lectine. Les protéines fixées de façon non spécifique sont éliminées en rinçant la résine avec du PBS. Les protéines fixées, glycosylées, sont décrochées grâce au passage d'une solution de 1 M méthylmannopyranoside. Des fractions de 500 µL sont récoltées au cours de l'élution. (B) quarante microlitres des fractions correspondant au pic d'absorbance sont analysés sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie. (C) Analyse sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie, de l'échantillon avant purification sur la résine de lentil-lectine (1), des fractions non retenues sur la lentil lectine (2) et de l'échantillon élué avec 1M méthylmannopyranoside (3). Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués à gauche des figures.

Les fractions 10 à 18 sont réunies, déssalées et concentrées (volume final 250 µL) à l'aide d'une cellule Amicon possédant une membrane retenant les protéines de masse moléculaire supérieure à 30 kDa.

I-2.6.3. Purification par chromatographie d'exclusion

La dernière étape de purification permet de séparer les protéines selon leur taille, afin d'isoler gp120. L'échantillon concentré est injecté sur la colonne et des fractions de 500 µL sont recueillies au cours de l'élution puis analysées sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (figure 48). La protéine gp120 est élue majoritairement dans les fractions 26 à 28, correspondant au dernier pic d'absorbance élué. Ce résultat est surprenant puisque les protéines « contaminantes » de l'échantillon présentent un poids moléculaire inférieur à celui de gp120 (figure 47B) et devraient, de ce fait, être éluées après gp120. Cela suggère que les

protéines résiduelles existent sous la forme de multimères ou d'agrégat. Les fractions 26 à 28 sont réunies et concentrées.

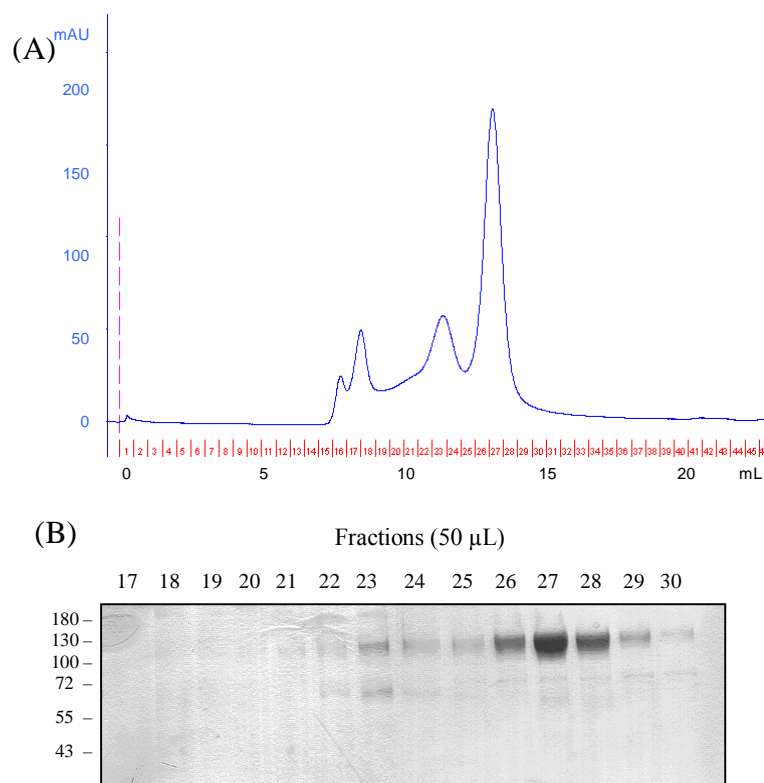


Figure 48 : étape de purification de gp120 par chromatographie d'exclusion

(A) Chromatogramme. En bleu : absorbance à 280 nm / En rouge : fractions. Les fractions sélectionnées suite à la seconde étape de purification sont réunies, déssalées et concentrées. L'échantillon obtenu est injecté sur une colonne d'exclusion Superdex 200, afin de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Des fractions de 500 μ L sont recueillies au cours de l'élution. (B) Cinquante microlitres des fractions correspondant aux pics d'absorbance sont analysés sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie. Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués à gauche de la figure.

I-2.6.4. Récapitulatif des différentes étapes de purification

Les étapes de purification sont récapitulées dans la [figure 49](#). Ce gel SDS-PAGE permet d'évaluer approximativement le degré de pureté de gp120. Chaque étape de purification permet d'affiner le degré de pureté de gp120. La chromatographie d'exclusion est une étape limitante du point de vue du rendement. En effet, pour obtenir une protéine bien pure (à environ 95%), seules les trois fractions correspondant à l'apex du pic ([figure 48](#)) ont été retenues, diminuant ainsi le rendement. Les quantités de protéine gp120 obtenues à l'issue de ces trois étapes sont suffisantes pour la suite de l'étude.

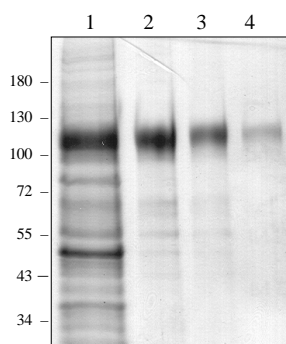


Figure 49 : récapitulatif des étapes de purification/concentration de gp120

A chaque étape de purification, des aliquots sont prélevés et analysés sur un gel SDS-PAGE 10%, coloré au bleu de Coomassie afin d'évaluer les rendements de purification. (1) Echantillon purifié par chromatographie échangeuse d'ions. (2) Echantillon obtenu à l'issue de la chromatographie d'affinité. (3) Concentration de l'échantillon précédent. (4) Echantillon obtenu à l'issue de l'étape de chromatographie d'exclusion. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche de la figure.

I-2.6.5. Purification des autres formes recombinantes de gp120

Les protéines mutantes ont subi le même protocole de purification que la forme sauvage de gp120 (figure 50). Pour chacune de ces protéines, le degré de pureté est estimé à environ 95%. Ces protéines sont enfin dosées par analyse d'acides aminés, sur un analyseur de type « Biochrom 30 ». Ces trois étapes de purification permettent d'obtenir 1 à 2 mg de protéine pure à partir d'un litre de milieu de culture.

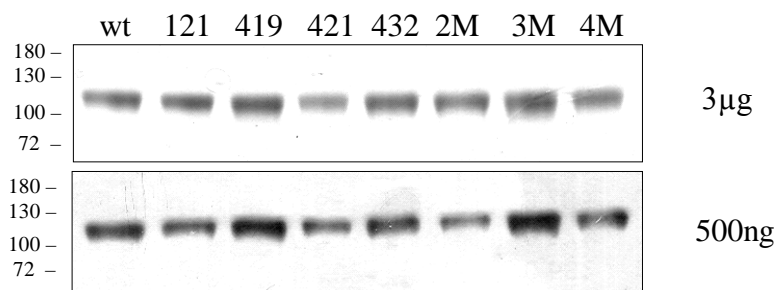


Figure 50 : purification des formes mutantes de gp120

Les formes mutantes de la protéine recombinante gp120 sont produites et purifiées dans les mêmes conditions que la forme sauvage de gp120. Trois microgrammes de chaque protéine sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie, afin d'analyser le degré de pureté de chaque protéine recombinante (en haut). Un Western Blot est réalisé, en parallèle, en déposant 500 ng de chaque protéine recombinante (en bas). La protéine gp120 est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre gp120 et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche des figures.

II- CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE GP120

La protéine gp120 recombinante sauvage va servir de témoin positif lors de l'étude des différentes formes mutées ; il est donc nécessaire de valider ses caractéristiques fonctionnelles. Lors de l'interaction entre le VIH et une de ses cellules cibles, gp120 interagit tout d'abord avec CD4, puis avec les corécepteurs au niveau de l'épitope CD4i. Il est également établi que les HS, à la surface cellulaire, participent à l'adsorption des virus sur les cellules. Nous avons donc choisi d'étudier, par différentes méthodes, l'interaction de la protéine gp120 recombinante, produite et purifiée au laboratoire, avec CD4, 17b (un anticorps dirigé contre l'épitope CD4i, mimant les corécepteurs) et l'héparine, analogue des HS. Certaines expériences ont également été réalisées avec les HS. La première approche a consisté à réaliser des études d'interaction, à l'aide d'un BIAcore 3000. La deuxième étude s'est intéressée à un aspect plus cellulaire, en analysant la fixation de gp120 à la surface de cellules exprimant CXCR4 et sa capacité à induire une voie de signalisation intracellulaire en aval du récepteur.

II-1. Etudes SPR

II-1.1. Principe

Le système BIAcore, basé sur la technologie SPR (*Surface Plasmon Resonance*) est un appareil qui permet de mesurer en temps réel des interactions biologiques sans aucun marquage de molécules. L'intérêt majeur est de pouvoir visualiser la cinétique de l'interaction et donc de mesurer les constantes d'affinité et de dissociation. Le principe général est d'enregistrer en continu, à la surface d'une lamelle réactive (appelée *sensorchip*), la modification de résonance induite par toute interaction moléculaire. Cette modification est directement proportionnelle à la masse de molécules fixées sur la lamelle.

En détail, la *sensorchip* est une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or de 50 nm d'épaisseur, riche en électrons libres, elle-même recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé sur laquelle est couplée de manière covalente la première molécule impliquée dans la réaction à étudier. L'autre partenaire de l'interaction est injecté à débit constant par un circuit microfluidique au contact de cette interface.

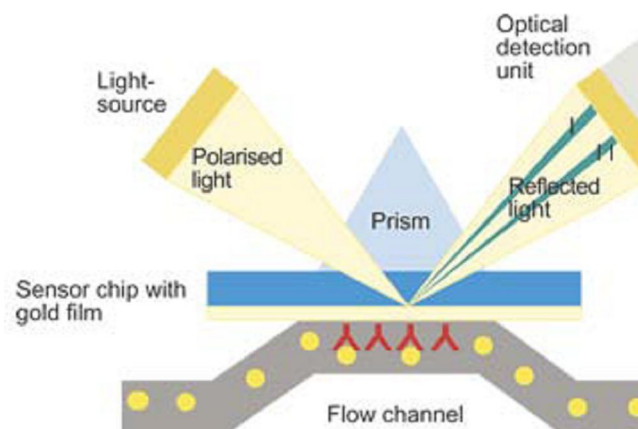


Figure 51 : principe de l'appareil BIAcore

Une lumière polarisée est envoyée sur un prisme de verre en contact avec la lamelle. Les photons du faisceau entrent en résonance avec les nuages électroniques de l'or (ou plasmons) (figure 51). Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui présente une chute d'intensité, à un angle défini (l'angle de résonance). Cet angle varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu dans lequel baigne le dextran, c'est-à-dire qu'il sera d'autant plus important que la quantité de protéines liées sera forte. Le signal est exprimé en unité de résonance (RU) : 1000 RU correspondent à la fixation de 1 ng de protéine par mm² de surface. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance s'appelle un sensorgramme : il permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur la *sensorchip* (figure 52).

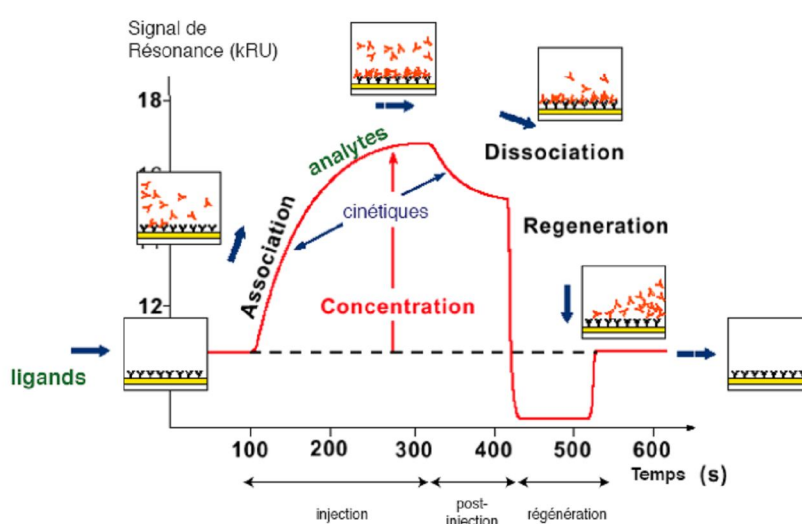


Figure 52 : sensorgramme type obtenu avec le BIAcore

II-1.2. Etude de la forme recombinante sauvage de gp120

L'interaction gp120/CD4 a été analysée en utilisant une surface fonctionnalisée avec des molécules CD4 produites dans des cellules CHO (1050 RU). Une surface fonctionnalisée avec l'anticorps anti-CD4i, 17b (710 RU), mimant les corécepteurs, a également été réalisée afin d'étudier l'interaction gp120/17b. De plus, la boucle V3 et le site CD4i sont également des sites d'interaction avec les HS et l'héparine^{806,807}. Une troisième surface, fonctionnalisée avec de l'héparine (21 RU), a donc été réalisée pour étudier l'interaction de gp120 avec ces polysaccharides.

Une gamme de concentrations croissantes de gp120 (0 à 200 nM) est réalisée en injectant gp120 sur la surface CD4 (figure 53). Cette première étape permet de vérifier que gp120 interagit avec CD4 et de définir la concentration de gp120 à utiliser pour la suite des expériences SPR. La protéine gp120 produite et purifiée au laboratoire interagit avec CD4 de façon dose-dépendante. Une concentration de 50 nM fournissant une amplitude de signal convenable, les expériences ultérieures sont donc réalisées à cette concentration. La constante d'affinité (Kd) de l'interaction, calculée à partir des constantes cinétiques, s'élève à 8,5 nM, une valeur en accord avec celle de 6 nM déterminée par d'autres équipes⁸⁰⁸. Ces travaux permettent de montrer que gp120 est fonctionnelle vis-à-vis de la reconnaissance de CD4.

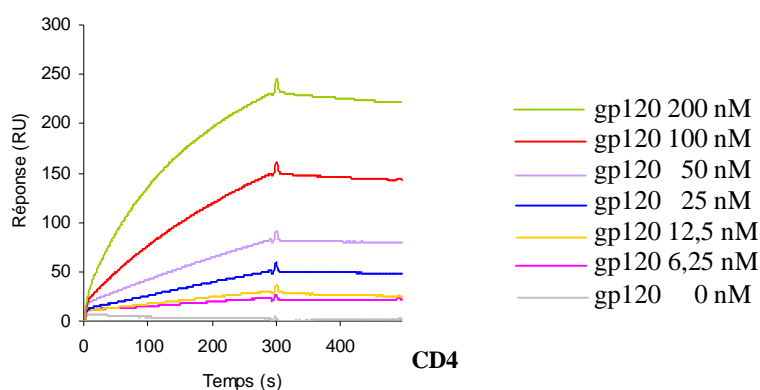


Figure 53 : analyse SPR de l'interaction gp120/CD4

La protéine gp120 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ou 200 nM) est injectée sur une surface activée avec CD4 à un débit de 10 μ L/min pendant 5 min, pour analyser la phase d'association. Puis, du tampon HBS-P est injecté à 10 μ L/min, pendant 3 min pour analyser la phase de dissociation. La réponse est exprimée en unités de résonance (RU) en fonction du temps.

⁸⁰⁶ Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. and Norcross, M. A. (1995) *J Virol* **69** (4), 2233-2239

⁸⁰⁷ Vives, R. R., Imbert, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (22), 21353-21357

⁸⁰⁸ Zhang, W., Godillot, A. P., Wyatt, R., Sodroski, J. and Chaiken, I. (2001) *Biochemistry* **40** (6), 1662-1670

La protéine gp120 (50 nM), préincubée ou non avec CD4 (50 nM), est également injectée sur la surface 17b (figure 54). La protéine gp120, seule, se fixe faiblement à 17b. En présence de CD4 soluble (sCD4), l'épitope CD4i est créé ou démasqué ; le complexe gp120/CD4 se fixe alors sur la surface 17b. L'injection de sCD4 seul n'engendre pas de fixation significative sur la surface 17b (résultats non présentés). Ainsi, la fixation de CD4 sur gp120 entraîne bien un changement conformationnel, induisant l'exposition du site CD4i.

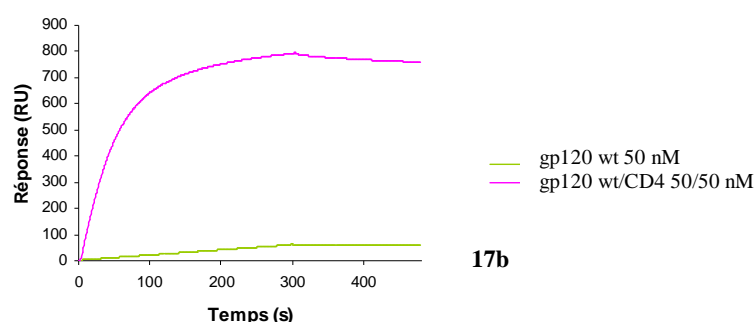


Figure 54 : analyse SPR de l'interaction gp120/17b en présence ou non de sCD4

La protéine gp120 (50 nM), préincubée (courbe rose) ou non (courbe verte) pendant 30 min avec 50 nM de sCD4, est injectée sur une surface activée avec 17b à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 5 min, pour analyser la phase d'association. Puis du tampon HBS-P est injecté à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 3 min pour analyser la phase de dissociation.

Des expériences similaires sont réalisées sur la surface héparine. La protéine gp120 (0 à 200 nM) est injectée sur la surface afin d'étudier son comportement vis-à-vis de l'héparine et de déterminer la concentration optimale à utiliser (figure 55A). Une concentration de 50 nM de gp120 est également retenue. Puis, gp120 (50 nM), seule ou préincubée avec sCD4 (50 nM), est injectée sur la surface d'héparine (figure 55B). La protéine gp120 seule se fixe sur la surface (195 RU), probablement par l'intermédiaire de sa boucle V3. En présence de CD4, la fixation de gp120 est augmentée (411 RU). Deux hypothèses permettent d'expliquer ce résultat. Les changements conformationnels de gp120, induits par CD4, pourraient favoriser l'interaction de gp120 avec l'héparine en augmentant l'accessibilité de la boucle V3 et/ou en stabilisant sa structure dans une conformation plus favorable à la reconnaissance par l'héparine. Néanmoins, des études⁸⁰⁹ ont montré que la boucle V3 est une structure très flexible et elle le reste, même après la fixation de CD4, suggérant que cette hypothèse n'est pas valide. La deuxième hypothèse est que la fixation de CD4 entraîne la création, sur gp120, d'un nouveau site d'interaction avec l'héparine. Des données de modélisation moléculaire (Anne Imberty, CERMAV Grenoble) ont suggéré que ce nouveau site pourrait correspondre à l'épitope CD4i (figure 64).

⁸⁰⁹ Hsu, S. T. and Bonvin, A. M. (2004) *Proteins* **55** (3), 582-593

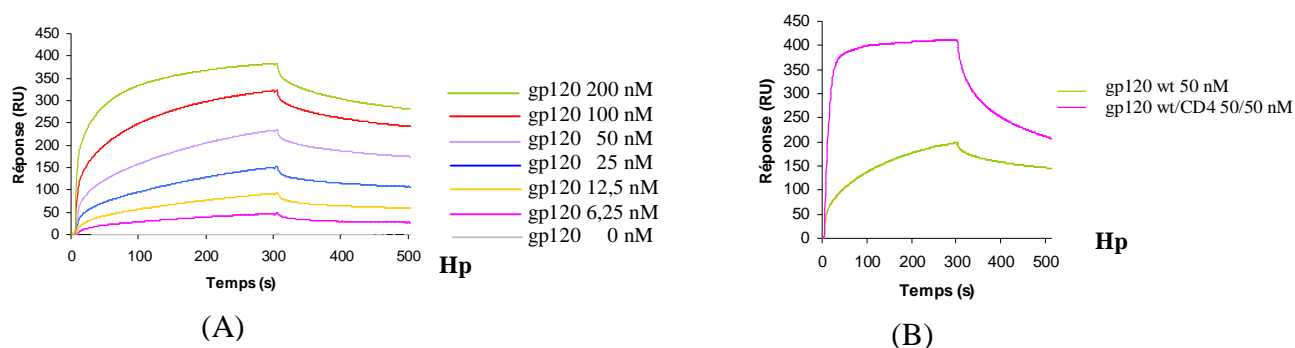


Figure 55 : analyse SPR de l'interaction gp120/héparine

(A) La protéine gp120 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ou 200 nM) est injectée sur une surface activée avec de l'héparine, à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 5 min. (B) La protéine gp120 (50 nM), préincubée (courbe rose) ou non (courbe verte) pendant 30 min avec 50 nM de sCD4, est injectée sur une surface activée avec de l'héparine, dans les mêmes conditions expérimentales que (A). Dans les deux cas, du tampon HBS-P est ensuite injecté à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 3 min, pour analyser la phase de dissociation.

L'affinité de gp120 pour l'héparine est, ensuite, mesurée en présence ou non de mini-CD4, un peptide synthétique correspondant à une partie du domaine D1, portant le site de fixation à gp120 (F. Baleux, Institut Pasteur, Paris). La capacité du mini-CD4 à interagir avec gp120 et à induire la création du site CD4i est identique à celle du CD4 entier (résultats non montrés, vérifiés par BIAcore et lors des expériences de chimiotaxie et de mobilisation du calcium).

Pour étudier l'affinité de gp120 pour l'héparine, gp120 est injectée à différentes concentrations (100 nM, 150 nM, 200 nM et 300 nM) pendant 25 min, à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. De la même façon, différentes concentrations de complexes gp120/mini-CD4 sont injectées sur la surface héparine. Malgré la longueur de l'injection, l'équilibre ne semble pas complètement atteint. Les valeurs mesurées à la fin de la phase d'injection, analysées par la méthode de Scatchard, donnent donc une estimation approximative de l'affinité (figure 56). La constante d'affinité (K_d) de gp120 pour l'héparine est de 39 nM lorsque gp120 n'est pas complexée au mini-CD4 et de 18 nM en présence de mini-CD4.

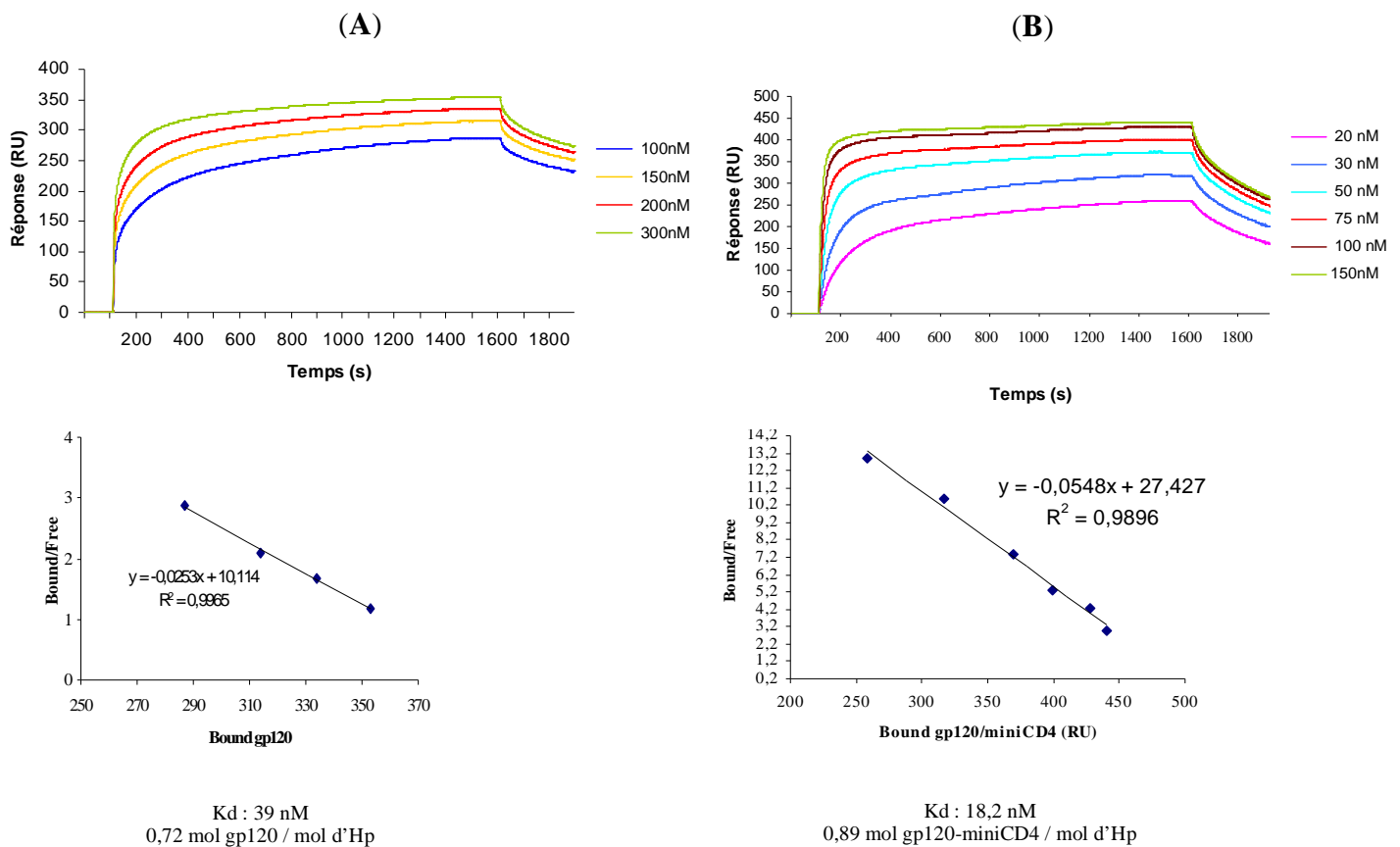


Figure 56 : étude de l'affinité de gp120 pour l'héparine

(A) gp120 (100, 150, 200 et 300 nM) est injectée sur une surface d'héparine pendant 25 min, à un débit de 10 μ L/min. les données à l'équilibre sont analysées par la méthode de Scatchard afin de déterminer l'affinité de gp120 pour l'héparine et la quantité de gp120 fixée par chaîne d'héparine. (B) même expérience qu'en (A) avec des complexes de gp120 (20, 30, 50, 75, 100, 150 nM) préincubée avec du mini-CD4 (150 nM).

Cette première approche permet ainsi de valider les propriétés fonctionnelles de gp120, à savoir sa capacité à interagir avec CD4, 17b et avec l'héparine. De plus, la fixation de CD4 sur gp120 entraîne l'exposition d'un nouveau site d'interaction avec l'héparine. Les résultats obtenus à partir de la surface 17b montrent également que le site CD4i n'est pas exposé dans la conformation native de la protéine.

II-2. Analyse de l'interaction de gp120 avec le récepteur CXCR4

Les résultats obtenus précédemment montrent que gp120, en présence de CD4, fixe l'anticorps 17b, dont l'épitope chevauche celui des corécepteurs. Il est néanmoins important de vérifier que gp120 interagit avec les corécepteurs. La protéine produite au laboratoire appartient à l'isolat HXBc2, une souche TCLA (adaptée en laboratoire), de tropisme X4. Nous avons donc étudié, d'une part, son interaction avec le récepteur CXCR4, exprimé à la surface de cellules CEM, et, d'autre part, sa capacité à induire, comme la chimiokine SDF-1 α , la voie de signalisation du calcium et la chimiotaxie. Ces dernières expériences ont été réalisées en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris (Fernando Arenzana-Seisdedos et Patricia Rueda-Quero).

II-2.1. Etude de l'interaction gp120/CXCR4 par cytométrie en flux

L'interaction de gp120 avec CXCR4 a été étudiée, de façon indirecte, en analysant sa capacité à inhiber la fixation de l'anticorps anti-CXCR4, 12G5, à la surface des cellules CEM qui expriment CXCR4, CD4 mais pas les HS ([figure 57A](#)). La méthode a, dans un premier temps, été validée avec la chimiokine SDF-1 α , ligand naturel de CXCR4. Brièvement, les cellules sont incubées avec différentes concentrations de chimiokine (62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 2 μ M et 4 μ M), puis l'anticorps 12G5-FITC est ajouté et la fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux ([figure 57B](#)). L'inhibition de la fixation de l'anticorps sur CXCR4 par SDF-1 α est analysée en comparant la fluorescence de cellules incubées seulement avec 12G5-FITC. Par souci de clareté, seules les courbes obtenues avec 62,5 et 500 nM de chimiokine ont été représentées. SDF-1 α permet d'inhiber la fixation de 12G5 : à une concentration de 62,5 nM, l'inhibition s'élève à environ 50% ; elle est totale à des concentrations de 500 nM et plus. En revanche, le complexe gp120/CD4 (2/2 μ M) n'inhibe pas l'interaction 12G5/CXCR4 ([figure 57C](#)), suggérant que, dans ces conditions, gp120 ne se fixe pas à CXCR4.

Une hypothèse pourrait expliquer ces résultats : dans les conditions physiologiques, gp120 interagit avec CD4, à la surface cellulaire ; cette première étape pourrait permettre de concentrer localement la protéine à proximité de CXCR4, afin de faciliter l'interaction gp120/CXCR4. Dans ce sens, plusieurs travaux font état d'une colocalisation de CD4 et

CXCR4, à la surface cellulaire^{810,811}. Ici en revanche, gp120 étant préalablement incubée avec du CD4 soluble, la concentration locale, au niveau de CD4, à la surface des cellules, n'a pas lieu.

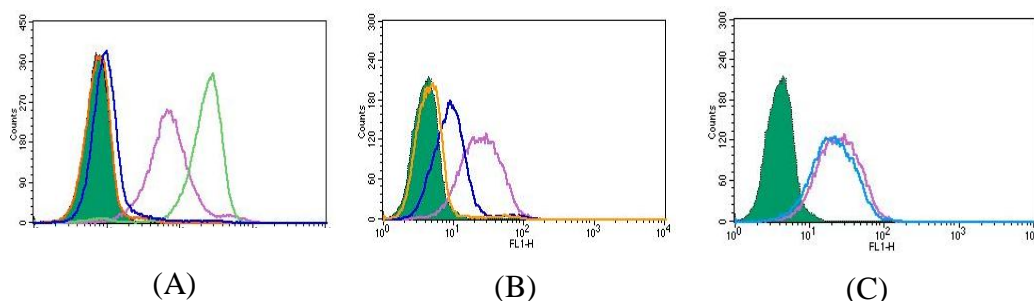


Figure 57 : inhibition de l'interaction 12G5-FITC/CXCR4 par SDF-1α ou gp120

En abscisse, FL1-H représente l'intensité de fluorescence. (A) les cellules CEM expriment CXCR4 (courbe rose), CD4 (courbe verte) et n'expriment pas les HS (courbe bleue). La fluorescence de base des cellules est visualisée par l'aire colorée en vert et la spécificité des anticorps est vérifiée par marquage isotopique (courbe orange). (B) SDF-1α (62,5 nM courbe bleue ou 500 nM courbe orange) inhibe la fixation de 12G5-FITC sur CXCR4 (courbe rose). (C) gp120/CD4 (2/2 μM en bleu) n'inhibe pas la fixation de 12G5-FITC sur CXCR4 (en rose).

La protéine gp120 produite au laboratoire ne semble donc pas interagir avec CXCR4, dans le système cellulaire utilisé. Cependant, des études ont montré que la protéine gp120 de la souche HXBc2 a tendance à s'adsorber dans les mêmes proportions à la surface de cellules qui expriment CXCR4 ou CCR5, suggérant que l'interaction gp120/CXCR4 peut être très difficile à étudier dans un système cellulaire. Dans ce sens, une équipe⁸¹² a développé des protéoliposomes paramagnétiques portant CXCR4 pour étudier l'interaction spécifique gp120/CXCR4. Cette partie sera détaillée dans le chapitre « discussion ».

II-2.2. Mobilisation de la voie du calcium

II-2.2.1. Principe

Les récepteurs à chimiokines sont également appelés « récepteurs couplés aux protéines G ». Ils sont en effet couplés à une protéine G hétérotrimérique intracellulaire, constituée des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$. Les protéines $G\alpha$ sont réparties en quatre classes ($G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_{12}\alpha$ ou $G_q\alpha$) qui modulent des voies de transduction différentes. L'activation d'un récepteur couplé à la protéine $G_q\alpha$ entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire. La société Euroscreen a utilisé cette propriété pour développer des lignées

⁸¹⁰ Popik, W., Alce, T. M. and Au, W. C. (2002) *J Virol* **76** (10), 4709-4722

⁸¹¹ Zaitseva, M., Romantseva, T., Manischewitz, J., Wang, J., Goucher, D. and Golding, H. (2005) *J Leukoc Biol* **78** (6), 1306-1317

⁸¹² Babcock, G. J., Mirzabekov, T., Wojtowicz, W. and Sodroski, J. (2001) *J Biol Chem* **276** (42), 38433-38440

cellulaires CHO coexprimant le récepteur CXCR4, la protéine $G\alpha 16$ chimérique et l'apoeaécorine (figure 58). $G\alpha 16$ est une protéine qui permet de coupler artificiellement un grand nombre de chimiorécepteurs à la voie du calcium, afin d'étudier la mobilisation du calcium par différents récepteurs à chimiokines.

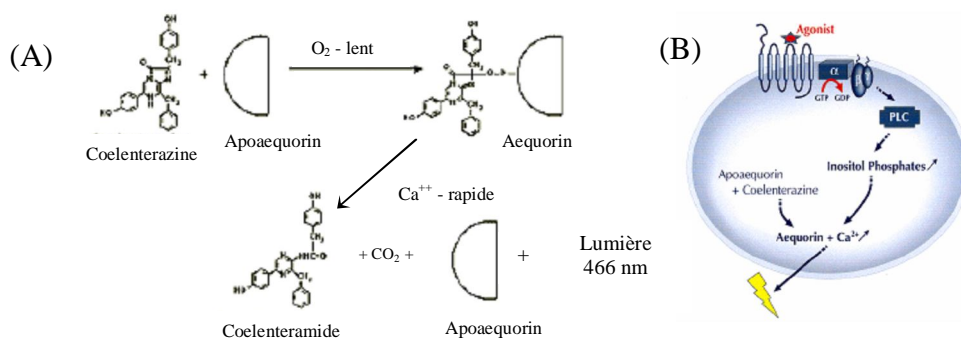


Figure 58 : principe de la détection du calcium développé par Euroscreen

(A) Principe de la génération de lumière par l'aeqorine, en présence de calcium intracellulaire. (B) Système cellulaire développé pour exprimer un récepteur à chimiokine, l'apoeaécorine et, éventuellement la protéine $G\alpha$.

Les cellules sont tout d'abord chargées en coelenterazine. L'apoeaécorine exprimée par la cellule est alors convertie en sa forme active, l'aeqorine, par la coelenterazine. Cette réaction est lente (2 à 3 h) et doit être réalisée à l'obscurité. Lorsqu'un ligand se fixe sur CXCR4, la voie de signalisation du calcium est induite et du calcium relargué. L'aeqorine, en présence du calcium, oxide alors la coelenterazine en coelenteramide avec production de CO_2 et émission de lumière pendant 20 à 30 s.

II-2.2.2. SDF-1 α induit la voie de signalisation du calcium

Classiquement, les cellules CHO expriment des héparanes sulfate. Les HS sont susceptibles d'interférer avec l'interaction gp120/CXCR4 puisque, comme le récepteur à chimiokines, ils se fixent à CD4i. Il est donc nécessaire de s'en affranchir pour étudier l'interaction gp120/CXCR4.

L'expression de CXCR4 ainsi que la dégradation des HS par traitement aux héparinases I et III sont tout d'abord vérifiées par analyse des cellules en cytométrie en flux (figure 59). Les résultats montrent que le traitement aux héparinases permet d'éliminer les HS, sans perturber l'expression du récepteur à chimiokines.

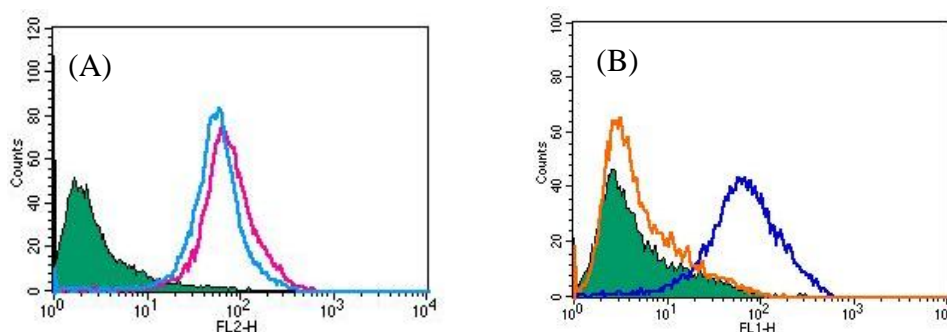


Figure 59 : les cellules CHO expriment CXCR4 et des HS

(A) Analyse de l'expression de CXCR4 sur les CHO traitées (bleu) ou non (rose) avec les héparinases I et III, pendant la charge des cellules en Coelenterazine. (B) Analyse de l'expression des HS sur les CHO traitées (orange) ou non (bleu) avec les héparinases I et III. Dans les deux cas, La fluorescence de base des cellules est représentée par l'aire verte.

L'induction de la voie de signalisation du calcium dans les cellules traitées ou non à l'héparinase est ensuite étudiée à une concentration de 300 nM de SDF-1 α , le ligand naturel de CXCR4, afin de vérifier que l'héparinase ne perturbe pas l'expérience. Les cellules sont chargées en coelenterazine et traitées ou non à l'héparinase, puis mises en contact avec SDF-1 α . La luminescence des cellules est mesurée pendant 20 s avant l'addition de SDF-1 α , puis pendant 25 s après ajout de la chimiokine, de façon à visualiser l'augmentation de la luminescence, induite par le relargage de calcium intracellulaire ([figure 60](#)). Les cellules non traitées donnent une réponse de luminescence à 1100 RLU (*Relative Luminescence Units*), alors que la luminescence des cellules traitées s'élève à 1500 RLU. Néanmoins, cette variation n'est pas significative et vient du fait que les cellules traitées à l'héparinase sont plus chargées en coelenterazine (résultats non montrés). La charge en substrat est vérifiée par lecture de la luminescence maximale des cellules lysées par la digitonine (2200 RLU pour les cellules non traitées contre 5000 RLU pour les cellules traitées). Ainsi, la dégradation des HS par l'héparinase ne perturbe pas l'étude de la mobilisation du calcium.

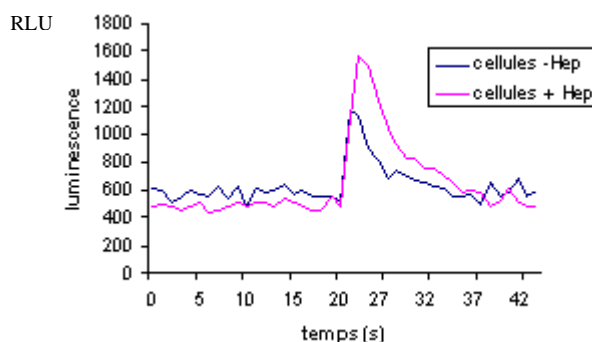


Figure 60 : SDF-1 α (300 nM) induit la voie de signalisation du calcium dans les cellules traitées ou non à l'héparinase

Les cellules traitées (rose) ou non (bleu) avec les héparinases I et III sont chargées en Coelenterazine puis mises en présence de 300 nM de SDF-1 α . La libération de calcium intracellulaire est visualisée par analyse de la luminescence des cellules. RLU : *Relative Luminescence Unit*

Les expériences ultérieures sont systématiquement réalisées sur des cellules préalablement dépourvues d'HS. Une gamme de SDF-1 α (100 nM, 300 nM et 1 μ M) est réalisée et permet de montrer que la libération du calcium intracellulaire induite par la fixation de SDF-1 α sur CXCR4 est dose-dépendante (figure 61).

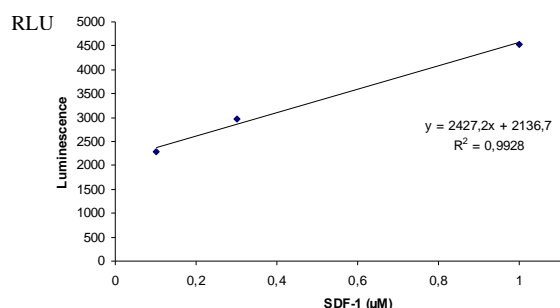


Figure 61 : la libération du calcium intracellulaire induite par la fixation de SDF-1 α sur CXCR4 est dose-dépendante

Les cellules sont chargées en coelenterazine et dépourvues d'HS puis mises en contact avec SDF-1 α (100 nM, 300 nM et 1 μ M). L'expérience est réalisée en trois exemplaires. La libération de calcium intracellulaire est visualisée par analyse de la luminescence des cellules.

II-2.2.3. La protéine gp120_{HXBc2} n'induit pas la voie de signalisation du calcium

La protéine gp120 issue de la souche HXBc2, produite en cellules d'insectes au laboratoire, ainsi la protéine gp120 d'un virus LAI (tropisme X4, 96.1% d'homologie de séquence avec gp120 d'HXBc2) produite en cellules de mammifères (Progenics) ont été étudiées en parallèle. Les deux protéines, en complexe avec du mini-CD4 (1/1 μ M), sont mises au contact des cellules chargées en coelenterazine et traitées à l'héparinase et la luminescence induite par la libération de calcium est mesurée. La protéine gp120 de la souche

HXBc2, produite en cellules d'insectes, n'induit pas la mobilisation du calcium. En revanche, la fixation de gp120_{LAI} sur CXCR4 induit une augmentation de la luminescence des cellules correspondant à un relargage de calcium intracellulaire (figure 62).

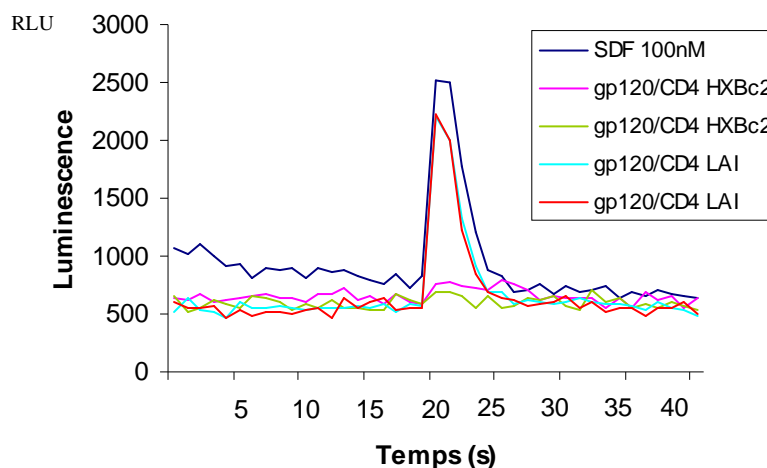


Figure 62 : mobilisation du calcium intracellulaire par des complexes gp120/CD4

Les cellules sont traitées avec les héparinases I et III et chargées en coelenterazine puis mises en présence de complexes gp120/mini-CD4 (1/1 μ M). Des protéines gp120 appartenant à deux souches différentes sont testées : gp120_{HXBc2} (en rose et en vert) et gp120_{LAI} (en rouge et en cyan). La libération de calcium intracellulaire est visualisée par analyse de la luminescence des cellules. Un témoin positif est réalisé avec 100 nM de SDF-1 α .

Ainsi, la protéine gp120_{HXBc2} produite au laboratoire, contrairement à gp120_{LAI}, n'induit pas la voie de signalisation du calcium. Deux différences caractérisent ces deux protéines : leur souche d'appartenance et le système d'expression utilisé pour les produire (cellules d'insectes pour gp120_{HXBc2} et cellules de mammifères pour gp120_{LAI}). Des hypothèses permettant d'expliquer ces résultats doivent donc être cherchées à partir de ces différences : de façon générale, la souche HXBc2 présente une plus faible affinité pour CXCR4 que les autres souches de tropisme X4. Par ailleurs, les cellules d'insectes produisent des glycosylations différentes de celles réalisées par les cellules de mammifères. Il est possible que ces deux paramètres entrent en jeu dans le fait que gp120_{HXBc2} n'induit pas la mobilisation du calcium intracellulaire. Néanmoins, cela ne signifie pas que gp120 ne se fixe pas à CXCR4 et plusieurs études^{813,814,815} ont montré que la signalisation n'est pas requise pour l'entrée du virus dans les cellules.

⁸¹³ Alkhatib, G., Locati, M., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E. A. (1997b) *Virology* **234** (2), 340-348

⁸¹⁴ Doranz, B. J., Orsini, M. J., Turner, J. D., Hoffman, T. L., Berson, J. F., Hoxie, J. A., Peiper, S. C., Brass, L. F. and Doms, R. W. (1999) *J Virol* **73** (4), 2752-2761

⁸¹⁵ Breilot, A., Heveker, N., Montes, M. and Alizon, M. (2000) *J Biol Chem* **275** (31), 23736-23744

II-2.3. Chimiotaxie

La chimiotaxie correspond à la migration orientée des cellules exprimant un chimiorécepteur vers la source de production de la chimiokine. *In vivo*, lors d'une réaction inflammatoire, les cellules immunitaires produisent des chimiokines qui vont diffuser dans le tissu, jusqu'aux vaisseaux sanguins. Les chimiokines, en se fixant aux HS présents sur toutes les cellules, vont établir un gradient chimiotactique, dans lequel les chimiokines vont être d'autant plus concentrées que le site d'inflammation sera proche. La fixation des chimiokines sur les leucocytes exprimant le chimiorécepteur va entraîner leur migration, suivant ce gradient, vers le site d'inflammation.

Cette propriété peut être utilisée *in vitro*, dans un système « Transwell », pour étudier la capacité de différents ligands à induire la migration cellulaire. Ce système particulier est constitué d'une plaque multipuits réceptrice dans laquelle le ligand est déposé à différentes concentrations (chambre inférieure) et d'un support multipuits perméable, constitué d'une membrane poreuse (5 µm dans notre cas), dans lequel sont déposées les cellules (chambre supérieure). La membrane doit laisser passer les cellules qui migrent de façon active (chimiotaxie induite par la fixation du ligand) mais les pores doivent être assez petits pour retenir les cellules. Le ligand déposé dans la chambre inférieure diffuse vers le compartiment supérieur ; il s'établit alors un gradient que les cellules chimiotactiques vont suivre pour passer dans la chambre inférieure. Après 3h d'incubation, les cellules du compartiment inférieur sont dénombrées.

La méthode a été optimisée et adaptée en plaques 96 puits avec la chimiokine SDF-1 α , puis a permis d'étudier la capacité de gp120 à induire la migration des cellules. Les protéines gp120_{HXBc2} et gp120_{LAI} ont, comme précédemment, été étudiées en parallèle.

SDF-1 α a servi à calibrer l'expérience de chimiotaxie : différents types cellulaires (A3.01 et Raji) ainsi que différentes quantités de cellules ($5 \cdot 10^4$ et 10^5 cellules par puits) ont été testés. Les cellules A3.01 sont des lymphocytes T qui expriment CD4, CXCR4 mais pas les HS. Les cellules Raji, en revanche, sont des lymphocytes B et expriment CXCR4, les HS mais pas CD4. Pour les deux types cellulaires, l'expression de CXCR4 a été, au préalable, vérifiée par cytométrie en flux. Les résultats (non présentés) ont montré que les Raji migrent très peu. En revanche, la fixation de SDF-1 α sur les cellules A3.01 entraîne une nette chimiotaxie des cellules et la migration est optimale pour une quantité de 10^5 cellules par puits. Les expériences de chimiotaxie ultérieures ont donc été réalisées sur des cellules A3.01, à une concentration de 10^5 cellules par puits. Dans ces conditions, en présence de 0,3 nM de

SDF-1 α , 37% des cellules migrent et, à 3 nM, la migration s'élève à 55% (figure 63).

Puis, la chimiotaxie des cellules A3.01 a été évaluée en réponse à différentes concentrations de gp120_{LAI} et HXBc2 (0,2 à 200 nM) complexée au mini-CD4 (200 nM). La protéine gp120_{LAI} présente une activité chimiotactique dose-dépendante : 35% des cellules migrent à une concentration de 20 nM de gp120 et 69% à 200 nM. En revanche, la protéine gp120_{HXBc2} produite en cellules d'insectes ne possède pas d'activité chimiotactique. Les hypothèses quant à ces résultats sont les mêmes que pour les expériences sur la mobilisation du calcium, à savoir un rôle éventuel des glycosylations. Mais ici encore, il faut noter que ces résultats n'excluent pas que gp120 se fixe à CXCR4 sans induire de chimiotaxie, puisque la signalisation ne semble pas une condition nécessaire à l'entrée du VIH dans les cellules (cf « discussion »).

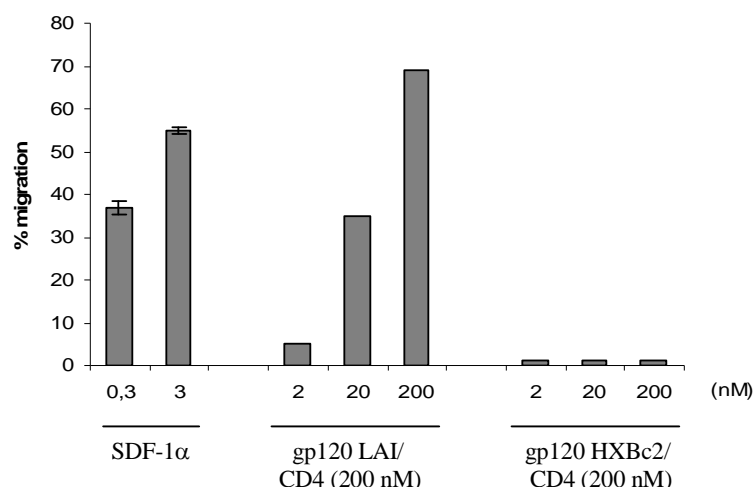


Figure 63 : chimiotaxie de cellules A3.01 induite par SDF-1 α ou gp120

La migration de lymphocytes T en réponse à SDF-1 α ou des complexes gp120/mini-CD4 est évaluée dans un système de Transwell. Le pourcentage de migration est calculé comme décrit dans le chapitre « matériel et méthodes ».

Bien que gp120 n'interagisse pas avec CXCR4, les caractéristiques fonctionnelles de la forme recombinante sauvage de gp120 ont été validées : elle interagit avec CD4, avec 17b (qui mime les corécepteurs) ainsi qu'avec l'héparine. Les résultats obtenus vont permettre une étude biochimique des interactions entre gp120 et ces différents ligands. En revanche, gp120 ne semble pas interagir avec CXCR4 dans le système cellulaire étudié et n'induit pas les voies de signalisation en aval du chimiorécepteur. La signalisation ne semble pas être une condition nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule ; néanmoins, il aurait été intéressant de vérifier par d'autres méthodes que la protéine gp120_{HXBc2} produite au laboratoire interagit avec CXCR4 (cf « discussion »).

III- ETUDE DU SITE CD4I

Les acides aminés K121, R419, K421 et K432 du site CD4i ont été décrits comme potentiellement impliqués dans l'interaction avec l'héparine ([figure 64](#)). En effet, l'observation de la surface MOLCAD de gp120, colorée en fonction du potentiel électrostatique, et l'utilisation du logiciel GRID (détermination des points d'interaction les plus probables d'un atome d'oxygène porté par un groupement sulfate sur la surface de gp120) ont permis d'identifier, au niveau de CD4i, un cluster d'acides aminés basiques (en rouge sur la figure), qui pourrait constituer un site d'interaction avec les HS.

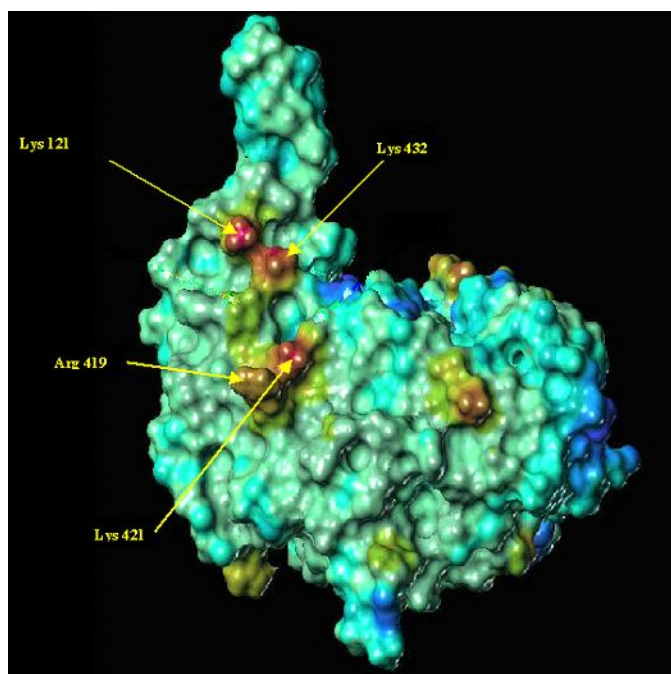


Figure 64 : modélisation moléculaire de la protéine gp120⁸¹⁶

Une molécule de gp120 de type X4 (HXBc2) a été modélisée à partir des données cristallographiques fournies par Kwong⁸¹⁷. La pointe en bas de la figure représente la base de la boucle V3. La surface MOLCAD de la glycoprotéine est colorée en fonction du potentiel électrostatique (de rouge pour basique à bleu pour acide).

Ces données de modélisation nous ont conduit à réaliser diverses mutations afin de vérifier l'implication relative de chacun de ces quatre acides aminés dans l'interaction de gp120 avec l'héparine.

L'analyse du site CD4i a été suivie par différentes techniques. Tout d'abord, des expériences d'interaction (BIAcore) ont permis de vérifier que les mutations réalisées n'affectent pas les propriétés fonctionnelles (interaction avec CD4, exposition du site CD4i) de la protéine. Puis, l'affinité relative de chaque protéine pour l'héparine a été analysée par

⁸¹⁶ Vives, R. R., Imbert, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (22), 21353-21357

⁸¹⁷ Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

chromatographie d'affinité. Dans un troisième temps, les résidus du site CD4i impliqués dans la fixation à l'héparine ont été caractérisés par une étude SPR. En parallèle, une technique permettant d'étudier, de façon générale, les domaines protéiques de fixation à l'héparine a été développée. Mise au point avec différentes protéines, elle a ensuite permis d'étudier les domaines de gp120 impliqués dans l'interaction avec l'héparine.

III-1. Etude fonctionnelle des protéines mutées

Dans un premier temps, il est important de vérifier que les mutations réalisées sur la protéine gp120 n'altèrent pas sa capacité à interagir avec CD4. De même, il est nécessaire d'étudier le comportement des protéines mutées, en complexe avec CD4, sur la surface 17b, afin de vérifier que l'épitope CD4i est toujours fonctionnel. En effet, parmi les quatre acides aminés du site CD4i mutés, trois (K121, R419 et K421) sont directement engagés dans l'interaction avec 17b⁸¹⁸.

Les protéines mutées ou non (50 nM) sont injectées sur la surface fonctionnalisée avec CD4 afin de vérifier que la ou les mutations réalisée(s) ne perturbe(nt) pas l'interaction de gp120 avec CD4 (figure 65). Toutes les protéines interagissent avec CD4, mais les protéines mutées fixent moins fortement CD4 que la forme sauvage de gp120. Ces différences restent minimales pour les simples mutants, mais, plus le nombre d'acides aminés mutés augmente, plus la fixation à CD4 diminue. Les mutations réalisées sur le site CD4i ne devraient pas perturber la fixation de gp120 sur CD4. Néanmoins, il est possible que les mutations influent légèrement sur la conformation de gp120. Par exemple, les mutations pourraient augmenter la flexibilité de la boucle V3, déplaçant légèrement l'équilibre entre les différentes conformations de gp120 vers une forme où CD4i est exposé. Le site de fixation à CD4 pourrait alors être moins accessible (cf discussion).

⁸¹⁸ Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. (1998) *Science* **280** (5371), 1949-1953

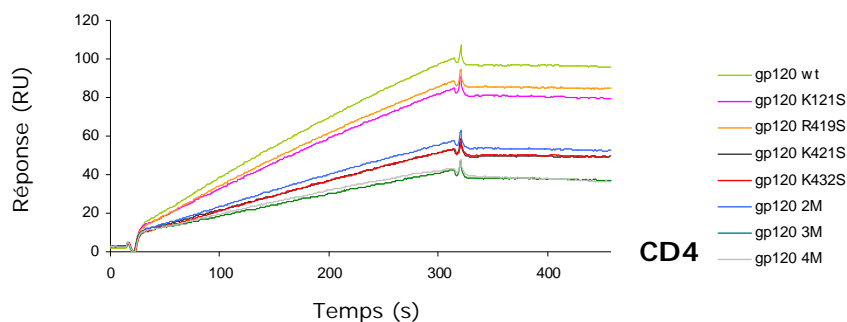


Figure 65 : analyse SPR de l'interaction des formes mutées de gp120 avec CD4

La protéine gp120 sauvage ou mutée (50 nM) est injectée sur une surface activée avec CD4, à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 5 min. Du tampon HBS-P est ensuite injecté à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 3 min, pour analyser la phase de dissociation.

Les protéines sauvage ou mutées (50 nM) sont ensuite injectées sur la surface 17b, seules ou préincubées avec CD4, afin de valider l'exposition du site CD4i par CD4 et sa capacité à reconnaître 17b. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes ([figure 66](#)). La protéine gp120, injectée seule sur la surface 17b, se fixe faiblement, quel que soit le ou les acide(s) aminé(s) muté(s). La préincubation avec CD4 entraîne une augmentation significative de la fixation de gp120 à l'anticorps 17b, pour toutes les protéines. La protéine sauvage et le mutant gp120-K121S présentent des réponses similaires. Les trois autres simples mutants présentent un signal relativement proche de celui observé pour la protéine sauvage.

Ces observations permettent de conclure que le site CD4i n'est pas exposé dans la conformation native de la protéine (faible fixation de gp120 seule) et, donc, que les mutations réalisées n'altèrent pas la conformation de la protéine. De plus, CD4 est capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i et celui-ci, muté sur l'un des quatre acides aminés étudiés, garde sa capacité à interagir avec 17b : il est donc fonctionnel.

Les protéines mutées sur 2 ou 3 résidus simultanément (2M ou 3M), en complexe avec CD4, présentent une réponse de fixation sur 17b plus faible que les simples mutants. De même, le quadruple mutant (4M), en présence de CD4, interagit 2,5 fois moins bien avec 17b que la protéine sauvage. Il est possible que ces quatre mutations aient affecté le site CD4i, réduisant son affinité pour 17b. Ainsi, plus le nombre de résidus mutés augmente, plus l'affinité de gp120 pour 17b diminue et les expériences ultérieures réalisées avec la protéine mutée sur les 4 acides aminés sont à relativiser, puisque le site CD4i semble altéré.

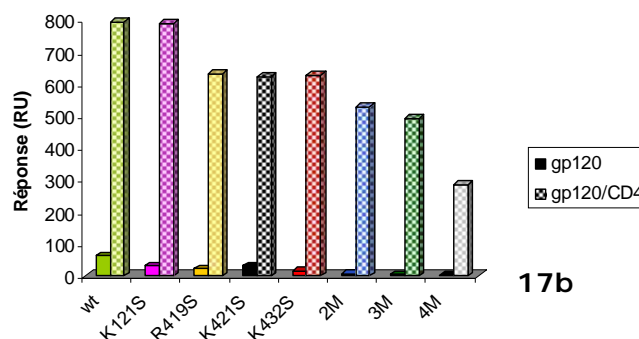


Figure 66 : analyse SPR de l'interaction CD4i/17b pour les formes mutées de gp120

Les différentes protéines recombinantes gp120 (50 nM), seules (histogrammes pleins) ou préincubées pendant 30 min avec 50 nM de sCD4 (histogrammes quadrillés), sont injectées sur une surface activée avec 17b à un débit de 10 μ L/min pendant 5 min, pour analyser la phase d'association. Puis du tampon HBS-P est injecté à 10 μ L/min, pendant 3 min pour analyser la phase de dissociation. Les réponses reportées dans les histogrammes ont été mesurées à la fin de la phase d'association.

Ces deux expériences permettent de conclure que les protéines produites (sauvage et simples mutants) sont fonctionnelles : elles interagissent avec CD4 et cette interaction expose l'épitope CD4i. Les mutants R419S, K421S et K432S montrent une fixation sur 17b, en présence de CD4, plus faible que la protéine sauvage. Cela peut s'expliquer par le fait qu'ils se fixent plus légèrement à CD4, comme le montre la [figure 65](#), et non par le fait que l'épitope CD4i pourrait être altéré.

Les résultats obtenus avec les multiples mutants suggèrent, en revanche, une altération partielle de l'épitope CD4i.

III-2. Identification des résidus de CD4i interagissant avec l'héparine

Après avoir validé la fonctionnalité des protéines mutantes (en particulier les simples mutants), il est possible d'étudier leur interaction avec l'héparine et l'implication relative de chacun des quatre résidus. Pour cela, deux types d'expériences ont été mis au point : une étude de l'affinité des mutants pour l'héparine par chromatographie d'affinité et des expériences SPR.

III-2.1. Etude de CD4i par chromatographie d'affinité

L'interaction des différentes protéines mutées avec l'héparine est étudiée en injectant les protéines sur une colonne d'héparine et en étudiant leur élution par application d'un gradient de sel. Les 8 protéines sont successivement injectées, l'élution est suivie à 232 nm et

les chromatogrammes sont reportés sur la [figure 67A](#). Pour chaque protéine, deux pics d'élution sont observés : un pic commun à toutes les protéines à 0,32 M NaCl (pic 1, [figure 67B](#)) et un pic qui varie de 0,45 à 0,53 M NaCl, selon le gradient théorique, en fonction de l'échantillon (pic 2, [figure 67B](#)). Les fractions correspondant aux deux pics d'élution sont analysées en Dot-Blot pour vérifier la présence de gp120 ([figure 67C](#)). Seul le deuxième pic correspond à gp120.

L'interaction entre l'héparine et les huit protéines injectées sur la colonne est déstabilisée par une concentration de NaCl variant de 0,45 M à 0,53 M ([figure 67D](#)). Ces différences ne semblent pas être significatives. Ainsi, toutes les protéines interagissent avec l'héparine et possèdent la même affinité pour le polysaccharide. Les mutations réalisées n'affectent pas la fixation des protéines, suggérant que cette interaction n'a pas lieu au niveau de l'épitope CD4i, lorsque la protéine est dans une conformation non liée à CD4. Cette expérience permet de conclure que les mutations n'affectent pas la fixation de gp120 à l'héparine lorsque le site CD4i n'est pas formé.

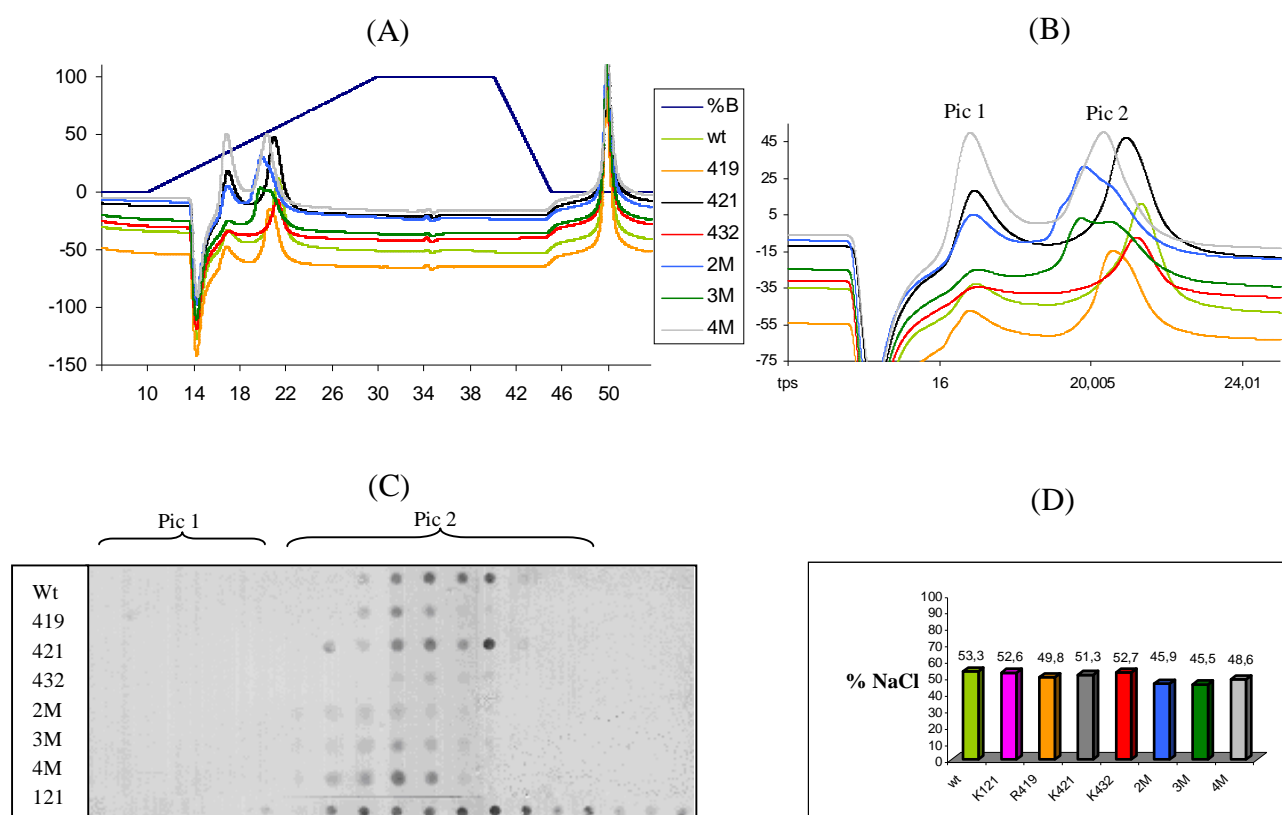


Figure 67 : étude de l'affinité de gp120 pour l'héparine

(A) Chromatogrammes correspondant à l'injection de 50 µg de gp120 (sauvage ou mutée) sur une colonne d'héparine. Après lavage de la résine, un gradient de NaCl variant de 0 à 1 M est appliqué. Les fractions correspondant au pic d'élution sont analysées en Dot-Blot (B). Zoom de (A). (C) 200 µL des fractions 32 à 50 sont déposées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine gp120 est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre gp120 et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. (D) Le pourcentage de NaCl nécessaire pour éluer chaque espèce de gp120 est détaillé sous la forme d'histogrammes.

Il serait nécessaire de réaliser cette expérience sur des complexes gp120/CD4 afin d'exposer l'épitope CD4i et d'étudier son affinité pour l'héparine. Néanmoins, des contraintes techniques rendent impossible la réalisation de cette étude, puisque les concentrations de sel utilisées déstabiliseraient, d'une part, l'interaction gp120/héparine, mais pourrait également affecter l'interaction gp120/CD4. Par ailleurs, les études d'interaction par chromatographie d'affinité sur la colonne d'héparine présentent l'inconvénient de ne pas retracer une véritable interaction dans le sens où l'héparine est en large excès par rapport à gp120 et ne représente donc probablement pas un bon système pour discriminer différents échantillons.

Ces limitations techniques nous ont conduit à étudier l'interaction gp120/héparine par des analyses SPR, qui présentent une géométrie se rapprochant d'avantage de la surface d'une cellule puisque les polysaccharides sont immobilisés sur une *sensorchip* et gp120 circule au contact de cette surface.

III-2.2. Etudes des interactions gp120/héparine au niveau du site CD4i

Deux types d'expériences SPR ont été réalisés dans le but d'étudier l'interaction gp120/héparine. L'engagement des acides aminés du site CD4i dans la fixation de l'héparine a tout d'abord été étudié de façon directe, par mesure d'interaction des mutants sur la surface d'héparine. Dans ce but, gp120, seule ou préincubée avec CD4, a été injectée sur une surface d'héparine. Puis les résidus de CD4i impliqués dans l'interaction avec le polysaccharide ont été étudiés de façon indirecte, en analysant le pouvoir compétiteur de l'héparine sur l'interaction gp120/17b, en présence de CD4. Dans ce cas, gp120 a été injectée, seule, préincubée avec CD4 puis avec CD4 et de l'héparine, sur une surface 17b.

III-2.2.1. Analyse directe

Pour analyser l'interaction gp120/héparine de façon directe, la protéine, sauvage ou mutée (50 nM) est injectée sur une surface d'héparine (figure 68). Comme lors de l'étude de l'interaction gp120/CD4, les protéines mutées fixent l'héparine avec une plus faible affinité que la forme sauvage de gp120. Le site CD4i n'étant pas exposé (puisque aucune de ces protéines ne reconnaît 17b en absence de CD4 – figure 66), toutes les protéines devraient présenter un signal de réponse similaire. L'hypothèse permettant d'expliquer ce résultat est similaire à celle donnée pour expliquer les différences de fixation des mutants sur la surface CD4 : gp120, non liée à CD4, oscille entre différentes conformations. Les protéines se fixent donc *via* leur boucle V3, mais certaines peuvent aussi se fixer par l'intermédiaire du site CD4i, parfois exposé. Si les résidus mutés sont engagés dans l'interaction avec l'héparine,

alors les protéines mutées fixeront moins bien le polysaccharide. Cette hypothèse permet également d'expliquer pourquoi les multiples mutants se fixent moins bien que les protéines mutées sur un seul résidu.

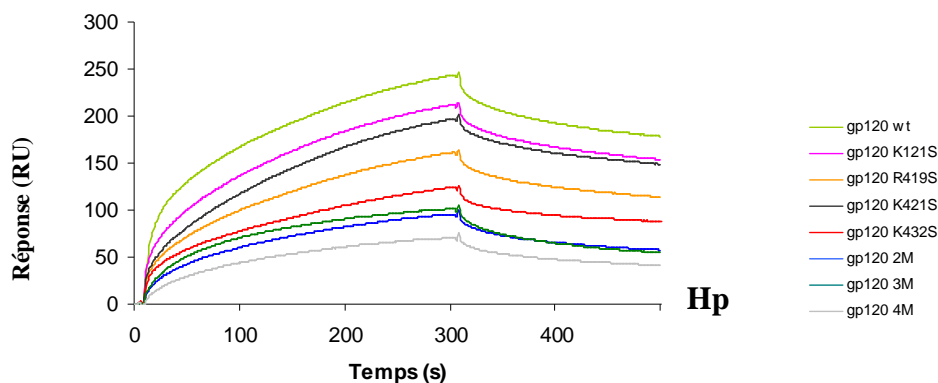


Figure 68 : analyse SPR des formes mutées de gp120 en interaction avec l'héparine

La protéine gp120 sauvage ou mutée (50 nM) est injectée sur une surface activée avec de l'héparine, à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 5 min. Du tampon HBS-P est ensuite injecté à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 3 min, pour analyser la phase de dissociation.

Les protéines gp120, sauvage ou mutées, sont ensuite injectées sur une surface fonctionnalisée avec de l'héparine, seules ou préincubées avec 50 nM de sCD4, dans le but, cette fois, d'étudier l'interaction CD4i/héparine et de définir les acides aminés engagés dans cette interaction. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes (figure 69).

En présence de CD4, la fixation de la protéine sauvage sur l'héparine est doublée (de 195 RU sans CD4 à 411 RU en présence de CD4), suggérant l'implication de CD4i dans la reconnaissance de l'héparine. Le mutant gp120-K121S présente une réponse identique à celle de la protéine sauvage. La lysine 121 ne semble donc pas impliquée dans la fixation à l'héparine. En revanche, la présence de CD4 n'augmente pas la liaison à l'héparine des mutants gp120-R419S, gp120-K421S et gp120-K432S. Les expériences rapportées dans les figures 66 et 67 démontrent, par ailleurs, que ces mutants fixent CD4 et sont fonctionnels pour l'exposition de CD4i. Ainsi, ces résultats permettent de conclure que les résidus R419, K421 et K432 sont effectivement engagés dans la liaison à l'héparine. En particulier, l'arginine 419 semble essentielle à l'interaction CD4i/héparine, puisqu'en présence de CD4, la fixation de gp120 à l'héparine n'augmente quasiment pas (124 RU sans CD4 et 139 RU avec CD4).

Les multiples mutants permettent de confirmer les résultats observés avec les simples mutants. Ils interagissent faiblement avec l'héparine et la préincubation avec CD4 n'engendre pas d'augmentation significative du signal. On peut noter que gp120-2M et gp120-3M,

différant par la mutation K121S, présentent des profils de réponse similaires : cela confirme que la lysine 121 n'interagit probablement pas avec l'héparine. Cependant, ces mutants fixant CD4 plus faiblement que la forme sauvage de gp120 ou les simples mutants, ces résultats sont à prendre avec prudence.

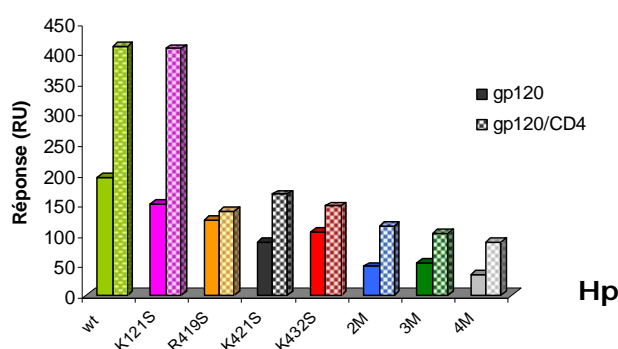


Figure 69 : analyse SPR de l'interaction gp120/héparine en présence de CD4

La protéine gp120 sauvage ou mutée (50 nM) est injectée, seule ou en préincubée avec 50 nM de sCD4, sur une surface activée avec de l'héparine, à un débit de 10 μ L/min, pendant 5 min. Du tampon HBS-P est ensuite injecté à 10 μ L/min, pendant 3 min, pour analyser la phase de dissociation. Les réponses reportées dans l'histogramme ont été mesurées à la fin de la phase d'association.

III-2.2.2. Analyse indirecte

La deuxième expérience permettant d'étudier l'interaction CD4i/héparine consiste à injecter, sur une surface fonctionnalisée avec 17b, la protéine gp120 seule, préincubée avec CD4 ou préincubée successivement avec CD4 puis avec de l'héparine. Plus l'affinité de l'héparine pour CD4i va être forte, plus la fixation du complexe gp120/CD4 sur 17b va être inhibée. Cette expérience a été réalisée avec la forme sauvage de gp120 puis avec les différents mutants. Le sensorgramme obtenu pour la protéine sauvage est détaillé dans la [figure 70](#). On a vu précédemment ([figure 66](#)) que CD4 augmente fortement l'affinité de gp120 pour 17b, en exposant l'épitope CD4i. En ajoutant, de l'héparine au complexe gp120/CD4 ([figure 70](#)), l'interaction CD4i/17b est presque totalement (à 93%) inhibée, indiquant que l'héparine entre en compétition avec 17b pour la fixation à CD4i. Du sCD4 seul (50 nM) et de l'héparine seule (200 nM) ont été injectés sur la surface afin de vérifier qu'ils n'induisent pas de réponse (résultats non présentés).

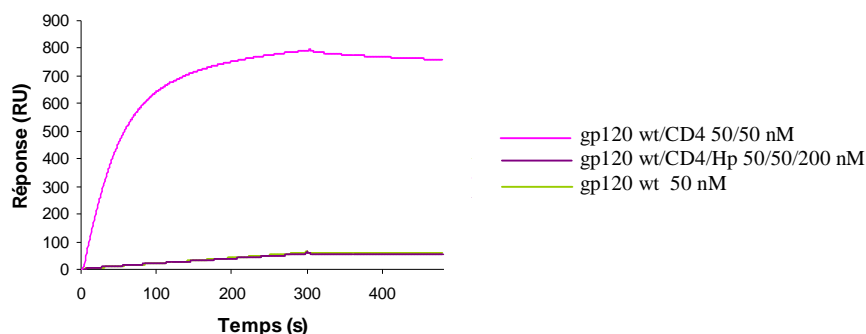


Figure 70 : l'héparine inhibe l'interaction CD4i/17b

La protéine gp120 (50 nM) seule (courbe verte), préincubée pendant 30 min avec 50 nM de sCD4 (courbe rose), ou successivement préincubée avec 50 nM de sCD4 puis 200 nM d'héparine (courbe bleue), est injectée sur une surface activée avec 17b à un débit de 10 μ L/min pendant 5 min, pour analyser la phase d'association. Puis, du tampon HBS-P est injecté à 10 μ L/min, pendant 3 min pour analyser la phase de dissociation.

Les résultats obtenus pour chaque protéine gp120 ont été synthétisés sous la forme d'histogrammes (figure 71). L'injection, sur la surface 17b, de gp120, au préalable incubée avec CD4 et avec l'héparine, permet de déterminer le pourcentage d'inhibition par l'héparine de l'interaction CD4i/17b (figure 71B). Plus l'affinité de l'héparine pour CD4i est forte, plus le pourcentage d'inhibition est élevé. Ainsi, les résultats montrent que l'héparine inhibe l'interaction de 17b avec gp120 sauvage et gp120-K121S respectivement à 93 et 92,5%, confirmant que l'absence de K121 n'empêche pas l'héparine de fixer l'épitope CD4i. En revanche, l'inhibition de l'interaction CD4i/17b par l'héparine diminue fortement pour les mutants gp120-R419S (58%) et gp120-K421S (62%), indiquant que ces acides aminés interagissent probablement avec l'héparine. Ce résultat confirme ceux obtenus par analyse de la fixation de gp120 sur la surface héparine. Le mutant gp120-K432S semble également interagir avec l'héparine, mais avec une plus faible affinité (81% d'inhibition).

Les résultats obtenus avec le double (gp120-R419S-K421S) et le triple mutant (gp120-K121S-R419S-K421S) confirment ceux obtenus avec les simples mutants. En effet, quand les deux acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'héparine (R419 et K421) sont mutés simultanément, l'inhibition par l'héparine devient plus faible (32%). Le fait d'ajouter la mutation K121S (acide aminé qui ne semble pas interagir avec l'héparine) n'engendre pas de baisse supplémentaire de l'inhibition par l'héparine. Le double et le triple mutant présentent, en effet, des profils de réponse similaires. Le pourcentage d'inhibition relativement élevé (47%) obtenu pour le quadruple mutant est à relativiser par le fait que gp120 seule ainsi que le complexe gp120/CD4 interagissent beaucoup plus faiblement avec 17b que les autres protéines mutantes, suggérant que le site CD4i est probablement altéré par ces quatre mutations simultanées.

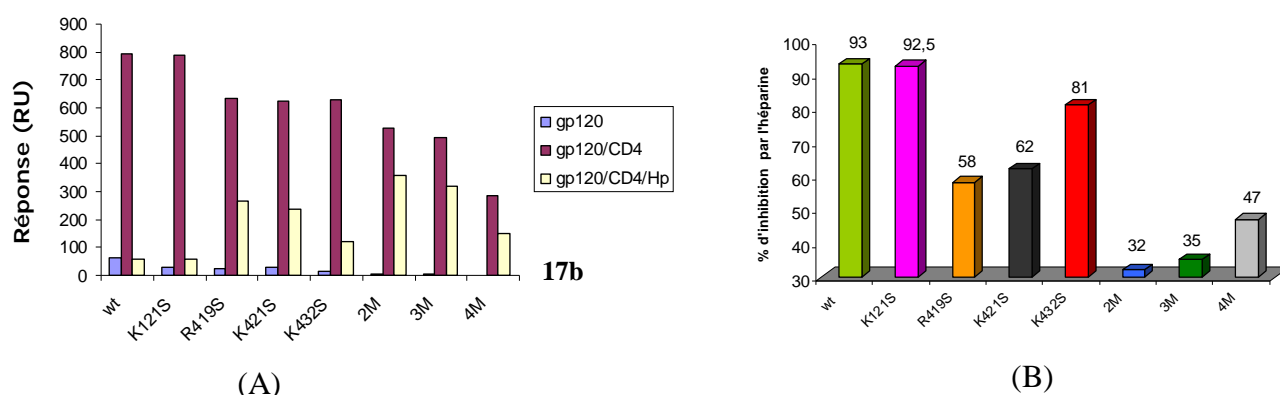


Figure 71 : analyse SPR de l'implication des acides aminés du site CD4i dans l'interaction avec l'héparine

(A) Les différentes protéines recombinantes gp120 (50 nM) seules (rectangles bleus), préincubées pendant 30 min avec 50 nM de sCD4 (rectangles rouges), ou successivement préincubées avec 50 nM de sCD4 puis 200 nM d'héparine (rectangles jaunes), sont injectées sur une surface activée avec 17b à un débit de 10 μ L/min pendant 5 min, pour analyser la phase d'association. Puis, du tampon HBS-P est injecté à 10 μ L/min, pendant 3 min pour analyser la phase de dissociation. Les réponses reportées dans l'histogramme ont été mesurées à la fin de la phase d'association. (B) A partir des résultats obtenus en (A), le pourcentage d'inhibition par l'héparine de l'interaction entre le complexe gp120/CD4 et 17b est calculé pour chaque protéine mutante selon la formule : $[(RU \text{ gp120/CD4} - RU \text{ gp120/CD4/Hp}) / RU \text{ gp120/CD4}] * 100$

Ces analyses SPR ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel que semblent jouer l'arginine 419 et les lysines 421 et 432 dans l'interaction du site CD4i avec l'héparine. En revanche, la lysine 121 n'interagit pas avec le polysaccharide.

III-2.2.3. Taille optimale des polysaccharides pour inhiber l'interaction CD4i/17b

Des oligosaccharides de différente taille (dp8 à dp16) ont été utilisés pour inhiber l'interaction CD4i/17b, afin de définir la taille optimale des oligosaccharides nécessaires à cette inhibition. Cette expérience a été réalisée en injectant des complexes CD4/oligos/gp120 sauvage sur la surface 17b (figure 72).

L'interaction de gp120 avec 17b, en présence de CD4, est inhibée par un dp10, à environ 40% et par un dp12-14 à environ 65%. Des oligosaccharides de taille supérieure ainsi que l'héparine de 6 kDa (correspondant environ à un dp22-24) inhibent totalement l'interaction.

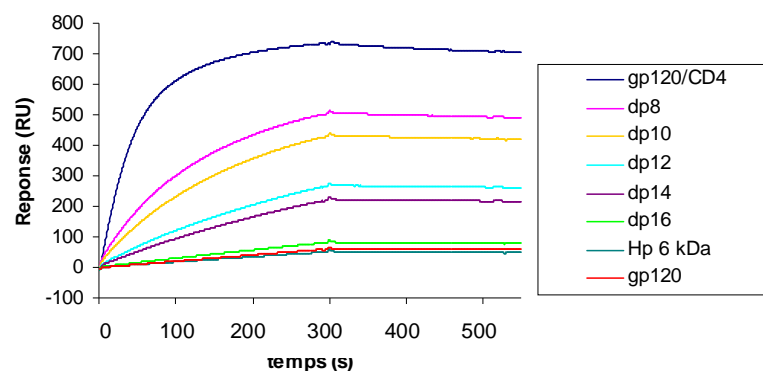


Figure 72 : des oligosaccharides de différentes tailles inhibent l'interaction CD4i/17b

La protéine gp120 sauvage (50 nM) seule (courbe rouge), préincubée pendant 30 min avec 50 nM de sCD4 (courbe bleu foncé), ou successivement préincubée avec 50 nM de sCD4 puis 200 nM d'oligosaccharides (dp8, dp10, dp12, dp14, dp16 ou héparine), est injectée sur une surface activée avec 17b à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 5 min, pour analyser la phase d'association. Puis du tampon HBS-P est injecté à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, pendant 3 min pour analyser la phase de dissociation.

Ces données fournissent des premiers résultats quant à la taille optimale des oligosaccharides inhibant efficacement l'interaction gp120/17b.

III-3. Etude du site CD4i par la « méthode des billes »

Au delà du site CD4i, il est clair que gp120 possède d'autres sites d'interaction avec les HS, en particulier la boucle V3. La production des mutants étant longue et fastidieuse à développer, et risquant de donner lieu à des protéines mal repliées, nous avons développé une méthode simple d'identification des domaines protéiques impliqués dans les mécanismes de reconnaissance « protéines-oligosaccharides ».

III-3.1. Principe

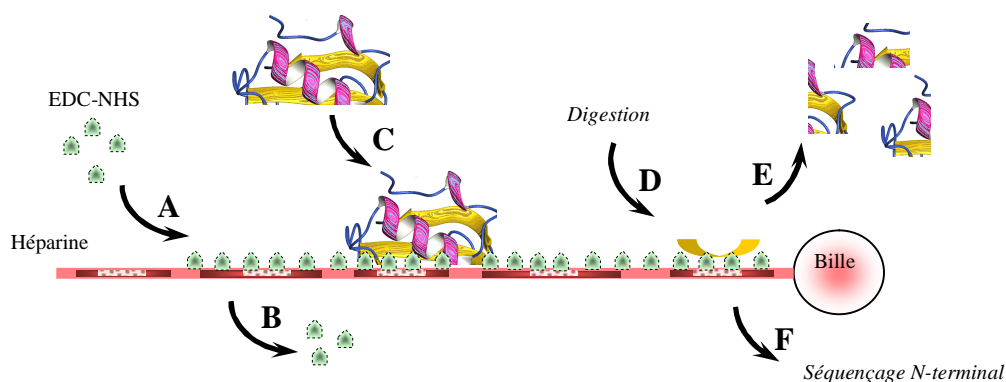


Figure 73 : méthode d'étude des interactions « protéines-oligosaccharides »

A : Activation des groupes carboxyliques de la chaîne d'héparine par un agent cross-linkant ; B : Elimination de l'excès d'EDC/NHS ; C : Incubation de la protéine d'intérêt sur les billes-héparine ; D : digestion protéolytique des complexes ; E : Elimination des fragments protéiques non fixés sur la chaîne d'héparine ; F : séquençage N-terminal des fragments protéiques couplés à l'héparine.

Cette approche ([figure 73](#)) permet d'identifier les sites d'interaction d'une protéine donnée avec l'héparine. Elle est basée sur l'utilisation de billes fonctionnalisées avec des chaînes d'héparine. Les groupements carboxyliques de l'héparine sont préalablement activés avec les agents couplants EDC/NHS, pour former des esters de succimides qui pourront réagir de façon covalente avec les amines primaires des lysines de la protéine. Une fois les agents couplants en excès éliminés, les billes sont mises en contact avec la protéine à étudier. Après élimination des protéines non fixées, les billes sont soumises à une protéolyse enzymatique et les fragments protéiques relargués sont éliminés. Les peptides fixés sur l'héparine subissent un séquençage N-terminal afin d'identifier le site de fixation à l'héparine et, précisément, les acides aminés engagés dans le couplage.

III-3.2. Mise au point de la technique avec différentes protéines

Deux protéines, dont les domaines de fixation à l'héparine sont déjà connus, ont été utilisées pour valider l'approche des billes : la glycoprotéine d'enveloppe gC du virus de la pseudorange et la chimiokine RANTES (9-68).

III-3.2.1. gC

La protéine gC possède sept séquences proches des motifs consensus de liaison à l'héparine (XBBXB ou XBBBXXBX où B représente un acide aminé basique). Parmi celles-ci, trois domaines de fixation à l'héparine (HBD pour *heparin binding domain*) ont été identifiés par des expériences de mutagenèse dirigée^{819,820} : HBD1 (⁷⁵SRRKPPRN⁸²), HBD2 (⁹⁵AHGRJRI¹⁰¹) et HBD3 (¹³⁵YRRGRFR¹⁴¹). L'approche développée au laboratoire a identifié deux séquences, correspondant aux HBD1 et HBD2 ([figure 74](#)). Les acides aminés notés en rouge correspondent aux résidus basiques engagés dans le couplage ; ils sont facilement identifiés, car lors du séquençage N-terminal, ils restent fixés à l'héparine, ne sont donc pas relargués et apparaissent comme un « trou » dans la séquence déterminée. L'activation des acides carboxyliques de l'héparine par EDC/NHS permet, en théorie, à l'héparine de se fixer spécifiquement sur les amines primaires des lysines. Néanmoins, du couplage est également observé au niveau des arginines, indiquant que la méthode des billes n'est pas restreinte à l'identification de domaines contenant des lysines. La Lys⁹², située entre les deux HBD identifiés, semble également engagée dans le couplage avec l'héparine, ceci suggérant que les deux HBD (et la Lys⁹²) pourraient constituer un large domaine unique

⁸¹⁹ Flynn, S. J. and Ryan, P. (1996) *J Virol* **70** (3), 1355-1364

⁸²⁰ Trybala, E., Bergstrom, T., Spillmann, D., Svennerholm, B., Flynn, S. J. and Ryan, P. (1998) *J Biol Chem* **273** (9), 5047-5052

d'interaction avec l'héparine. Aucune séquence correspondant à l'HBD3 n'a été identifiée, même en augmentant la concentration de gC à 6 μ M.

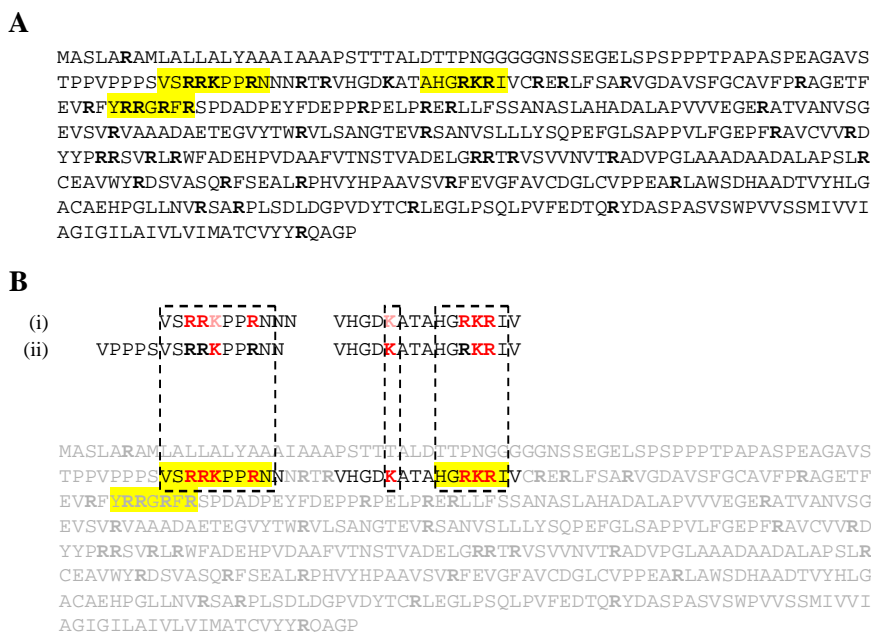


Figure 74 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de la protéine gC

(A) Séquence protéique de gC. Les lysines et les arginines sont représentées en gras et les domaines de fixation à l'héparine HBD1, HBD2 et HBD3 sont surlignés en jaune. (B) Analyse des peptides se liant à l'héparine, détectés par la méthode des billes. (i) et (ii) sont le résultat des deux expériences indépendantes réalisées avec 600 nM de gC. Les acides aminés impliqués dans le couplage avec l'héparine (*ie* les lysines (K) et les arginines (R) non détectées) sont représentés en rouge. Les résidus partagés par plusieurs séquences sont notés en rose ; leur implication dans le couplage avec l'héparine n'a pas pu être déterminée. Les peptides se liant à l'héparine ont été transposés dans la séquence complète de gC (en gris).

III-3.2.2. RANTES (9-68)

La chimiokine RANTES se fixe naturellement aux GAG, notamment aux HS, et cette interaction module l'activité de la chimiokine (cf bibliographie III-1.4.). RANTES possède deux groupes d'acides aminés basiques (⁴⁴RKNR⁴⁷ et ⁵⁵KKWVR⁵⁹), le premier ayant été défini comme un HBD par des expériences de mutagenèse dirigée. Néanmoins, une mutation de tous les acides aminés basiques de ce premier domaine n'abolit pas complètement l'interaction avec l'héparine, suggérant l'existence d'autres HBD⁸²¹.

L'approche des billes a été utilisée sur RANTES (9-68), une forme tronquée sur les neuf premiers résidus qui ne peut, de ce fait, plus dimériser (figure 75). Les résultats montrent un site unique de fixation à l'héparine : ⁴²VTRKNRQ⁴⁸, la lys⁴⁵ étant impliquée dans le couplage (non détectée au séquençage). Un deuxième peptide (⁹PCCFAYI¹⁶) est détecté : il correspond à la partie N-terminale de RANTES (9-68) et aucun résidu n'est engagé dans le couplage. Il

⁸²¹ Proudfoot, A. E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. and Wells, T. N. (2001) *J Biol Chem* **276** (14), 10620-10626

s'agit de la protéine entière, non digérée. En augmentant les concentrations de RANTES (9-68) de 300 nM à 10 μ M, un deuxième site d'interaction a pu être identifié. Ce site inclut le motif consensus (⁵⁵KKWVR⁵⁹) et pourrait correspondre à un site de faible affinité pour l'héparine, expliquant l'interaction résiduelle de l'héparine avec les protéines RANTES mutées sur le premier HBD⁸²². En augmentant la concentration de RANTES (9-68), du couplage sur la Lys³³ a également pu être détecté dans certains cas, suggérant une possible participation de ce résidu dans la liaison à l'héparine.

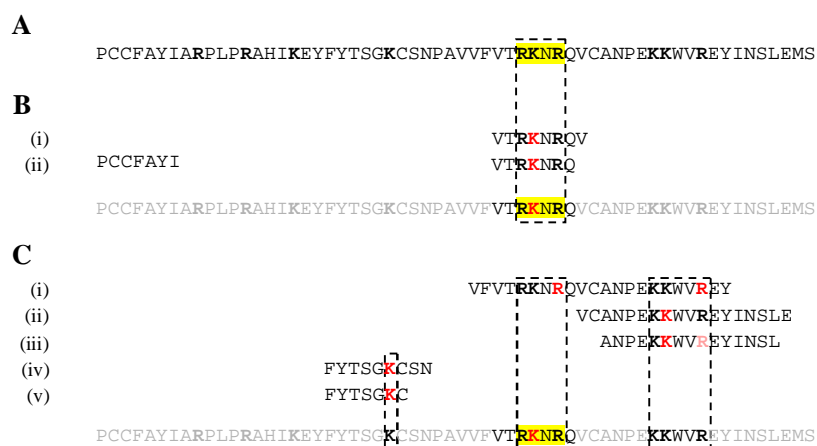


Figure 75 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de RANTES (9-68)

(A) Séquence protéique de RANTES (9-68). Les lysines et les arginines sont représentées en gras et le domaine de fixation à l'héparine est surligné en jaune. (B) Analyse des peptides se liant à l'héparine, détectés par la méthode des billes avec 300 nM de protéine. (i) et (ii) sont le résultat des deux expériences indépendantes. Les acides aminés impliqués dans le couplage avec l'héparine sont représentés en rouge et les résidus partagés par plusieurs séquences sont notés en rose. Les résultats obtenus sont reportés sur la séquence complète de RANTES (9-68) (en gris). (C) même que B avec 10 μ M de protéine. (i)-(v) correspondent aux séquences déterminées au cours de 5 expériences indépendantes.

La technique développée a ensuite été appliquée au fragment α 3LG4/5 de la laminine-5, dont les sites de fixation à l'héparine ne sont pas connus.

III-3.2.3. Le fragment α 3LG4/5 de la laminine-5

La laminine-5 est une glycoprotéine hétérotrimérique de la matrice se liant aux HS. Elle est composée de trois chaînes α 3 β 3 γ 2 et peut subir un clivage protéolytique qui affecte ses fonctions biologiques. Une étude récente a montré qu'un fragment issu de la protéolyse, correspondant aux domaines globulaires 4 et 5 de la partie C-terminale de la chaîne α 3 (α 3LG4/5), était capable de se lier aux chaînes d'HS des syndécans⁸²³. Ces résultats nous ont

⁸²² Proudfoot, A. E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. and Wells, T. N. (2001) *J Biol Chem* **276** (14), 10620-10626

⁸²³ Okamoto, O., Bachy, S., Odenthal, U., Bernaud, J., Rigal, D., Lortat-Jacob, H., Smyth, N. and Rousselle, P. (2003) *J Biol Chem* **278** (45), 44168-44177

conduits à choisir ce fragment afin d'en définir les domaines de fixation à l'héparine avec la méthode précédemment développée.

Le fragment $\alpha 3\text{LG4/5}$ (300 nM) a été incubé avec les billes d'héparine et l'analyse des peptides se fixant au polysaccharide a mis en évidence trois séquences différentes, avec un couplage au niveau des Arg⁸³, Lys⁸⁵, Lys¹⁴⁴ et Lys²⁶⁰ (figure 76). Arg⁸³ et Lys⁸⁵ sont situées au sein d'un motif consensus de liaison à l'héparine ⁸⁰KKLRIKSKEK⁸⁹. En revanche, Lys¹⁴⁴ et Lys²⁶⁰ ne semblent pas faire partie d'un domaine consensus. Il est possible que, lors du repliement de la protéine, ces résidus isolés se regroupent et forment un unique site de fixation à l'héparine avec la séquence ⁸⁰KKLRIKSKEK⁸⁹.

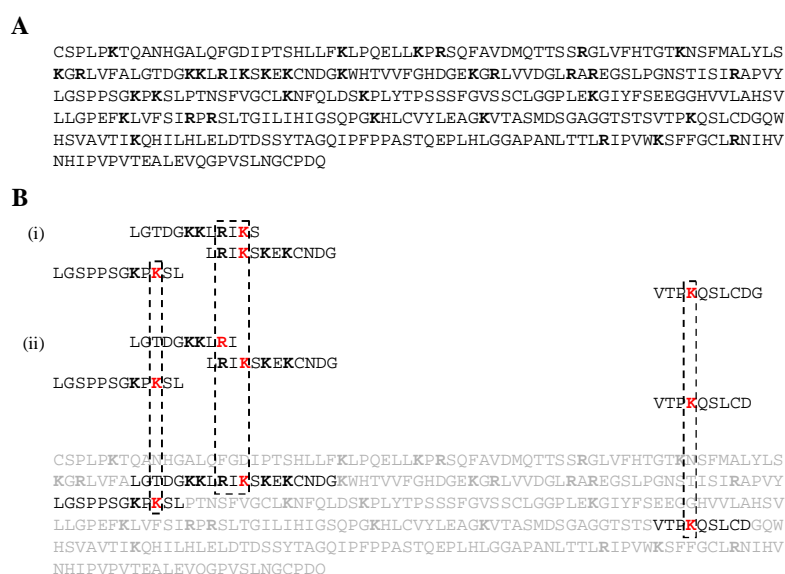


Figure 76 : analyse des HBD du fragment $\alpha 3\text{LG4/5}$ de la laminine

(A) Séquence protéique du fragment $\alpha 3\text{LG4/5}$ de la laminine. Les lysines et les arginines sont représentées en gras. (B) Analyse des peptides se liant à l'héparine, détectés par la méthode des billes. (i) et (ii) sont le résultat des deux expériences indépendantes. Les acides aminés impliqués dans le couplage avec l'héparine sont représentés en rouge. Les peptides se liant à l'héparine ont été transposés dans la séquence complète du fragment $\alpha 3\text{LG4/5}$ de la laminine (en gris).

III-3.3. Alternative : élimination des billes, utilisation d'oligosaccharides définis

Les billes commerciales utilisées sont fonctionnalisées avec de l'héparine, de structure et de taille globalement hétérogènes. Il peut être intéressant, notamment dans le cadre de l'étude des HBD de gp120, d'utiliser des oligosaccharides de taille et de structure connues. En particulier, les études SPR réalisées précédemment (figure 72) ont montré qu'un dodécasaccharide (dp12) suffit pour inhiber l'interaction gp120/17b, de façon significative. Sur cette base, une approche alternative a été développée afin d'étudier la fixation de gp120 sur un dp12. Pour cela, le support billes a été éliminé et l'expérience réalisée en solution. La

méthode a, dans un premier temps, été optimisée avec de l'héparine en solution.

L'héparine de 15 kDa (dont une fraction est biotinylée pour détecter le polysaccharide lors des différentes étapes de couplage et de purification) a tout d'abord été activée avec les agents couplants EDC/NHS, puis mise en présence de la protéine à analyser. La protéine a ensuite été protéolysée dans les mêmes conditions que l'expérience avec les billes-Hp. Puis, l'échantillon a été purifié sur une colonne de DEAE afin d'éliminer les agents couplants, les peptides non retenus par l'héparine et la thermolysine, et de retenir les complexes héparine/peptides ainsi que l'héparine seule.

Cette méthode en solution a été mise au point avec 10 μ M de RANTES (9-68) et 27 μ M d'héparine activée. La formation des complexes héparine/RANTES (9-68) a été vérifiée par Western Blot (figure 77). La totalité de RANTES (9-68) semble complexée à l'héparine. La protéine, une fois couplée à l'héparine paraît beaucoup plus immunoréactive que la protéine seule. Ce phénomène a déjà été observé précédemment⁸²⁴ ; inexpliqué, il ne s'agit cependant pas d'un signal non spécifique engendré par l'héparine, puis que le polysaccharide seul n'est pas immunoréactif.

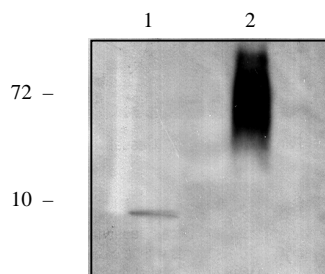


Figure 77 : analyse de la fixation de RANTES (9-68) à l'héparine activée

Cinq cents ng de RANTES (9-68) (1) ou 500 ng de RANTES (9-68) couplé à l'héparine (2) sont analysés sur un gel SDS-PAGE 10%, suivi d'un immunoblot. La protéine RANTES est détectée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre RANTES et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de chèvre. La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche de la figure.

Ce complexe est ensuite purifié sur une résine de DEAE, sans digestion préalable, afin d'étudier le profil d'élution des différentes espèces (conjugués, héparine seule et protéine seule) et de pouvoir suivre l'élution de la protéine, par révélation avec des anticorps (figure 78).

⁸²⁴ Vives, R. R., Sadir, R., Imberty, A., Rencurosi, A. and Lortat-Jacob, H. (2002) *Biochemistry* **41** (50), 14779-14789

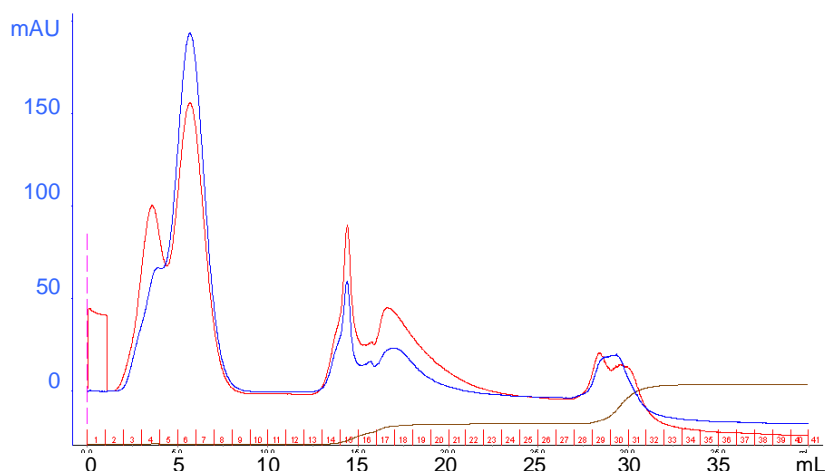


Figure 78 : profil d'élution des complexes héparine/RANTES (9-68)

L'échantillon est injecté sur la colonne préalablement équilibrée dans du tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM pH 6,5, à un débit de 1 mL/min. Après lavage de la colonne dans le même tampon, puis dans du tampon additionné de NaCl 0,3 M, les complexes héparine/peptides sont élués dans une solution de 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5 NaCl 1 M. L'absorbance est mesurée à 232 nm (en rouge) et 280 nm (en bleu) en parallèle et des fractions de 1 mL sont récoltées. La conductivité est visualisée en marron sur le chromatogramme.

Les fractions sont analysées en Dot-Blot afin de suivre l'élution de l'héparine, des conjugués protéines/polysaccharides et de la protéine (figure 79). Le dépôt des échantillons sur une membrane cationique (zétaprobe) (figure 79A) permet, *via* une révélation de la biotine, de détecter l'héparine. De la même façon, le dépôt sur une membrane de nitrocellulose permet de suivre l'élution des complexes protéines/héparine (figure 79B). En effet, l'héparine non complexée n'est pas retenue par la nitrocellulose, le signal visible correspond donc à de l'héparine biotinylée, complexée à la protéine. Enfin, la protéine est détectée par analyse des fractions sur une membrane de nitrocellulose et révélation par un anticorps spécifique (figure 79C). L'héparine (seule ou complexée à la protéine) est éluée avec 1 M de NaCl (figure 79A et B - fractions 30-34). RANTES (9-68) est détectée principalement dans les fractions éluées à 1 M de NaCl (figure 79C - fractions 30-32), ce qui suggère que la quasi-totalité de la protéine est complexée au polysaccharide. En effet, lorsque la protéine est injectée seule sur la colonne, elle n'est pas retenue (résultats non montrés). Ceci confirme les résultats obtenus par analyse des complexes en Western Blot (figure 77). Les fractions récoltées lors de l'élution avec 1 M NaCl contiennent donc l'héparine et les complexes héparine/RANTES (9-68).

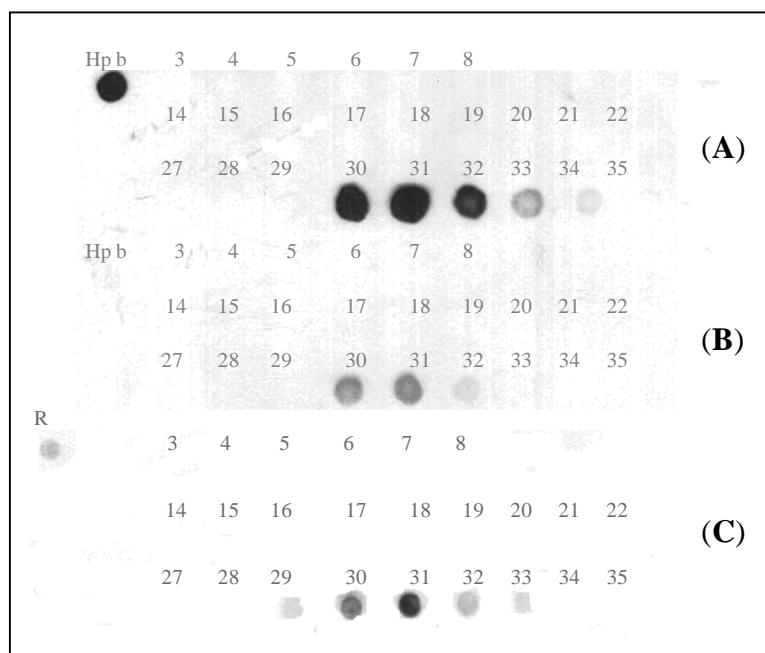


Figure 79 : analyse des fractions récoltées lors de la purification sur résine de DEAE

(A) Suivi de l'héparine : 100 ng d'héparine biotinylée (Hp b) ou 200 μ L des fractions sont déposés sur une membrane Zetaprobe (Biorad). Après saturation de la membrane, l'héparine biotinylée est détectée par révélation de la biotine avec de l'extravidine-HRP (1/7000). (B) Suivi des complexes héparine/RANTES (9-68) : même expérience qu'en (A) mais la membrane utilisée est la nitrocellulose. (C) Suivi de RANTES (9-68) : 300 ng de RANTES (9-68) (R) ou 300 μ L des fractions sont déposés sur une membrane de nitrocellulose (Biorad). Après saturation de la membrane, RANTES (9-68) est révélé avec un anticorps primaire de chèvre (1/1000), puis un anticorps secondaire-HRP dirigé contre les IgG de chèvre (1/5000).

La même expérience est ensuite réalisée en digérant, cette fois, la protéine avec la thermolysine, préalablement à la purification sur la résine de DEAE. Les fractions correspondant au pic d'élution à 1 M NaCl sont réunies et déssalées sur une colonne Pd10. l'échantillon récolté est enfin concentré à un volume inférieur à 100 μ L et les peptides retenus sont séquencés (figure 80). Les résultats obtenus en analysant les peptides de RANTES (9-68) retenus par l'héparine, en solution, sont semblables à ceux obtenus grâce à la méthode des billes. Le site de fixation à l'héparine 42 VTRKNRQ 48 est visualisé, la Lys 45 étant impliquée dans le couplage (non détectée au séquençage). Comme précédemment, la digestion par la thermolysine semble incomplète et la partie N-terminale de RANTES (9-68) est détectée au séquençage. En augmentant les concentrations de RANTES (9-68) de 3 à 10 μ M (figure 80C), le site de faible affinité pour l'héparine 55 KKWVR 59 est identifié, l'Arg 59 étant probablement impliquée dans le couplage avec l'héparine.



Figure 80 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de RANTES (9-68)

(A) Séquence protéique de RANTES (9-68). Les lysines et les arginines sont représentées en gras et le domaine de fixation à l'héparine est surligné en jaune. (B) Analyse des peptides se liant à l'héparine, détectés avec 3 μ M de protéine. Les acides aminés impliqués dans le couplage avec l'héparine sont représentés en rouge. Les résultats obtenus sont reportés sur la séquence complète de RANTES (9-68) (en gris). (C) Même expérience que (B) réalisée avec 10 μ M de protéine.

Cette approche permet donc de détecter les domaines de fixation à l'héparine de RANTES (9-68), identifiés avec la méthode des billes. En revanche, elle semble plus spécifique car la Lys³³ parfois observée avec la méthode des billes n'apparaît pas.

III-3.4. Application à gp120

L'expérience est ensuite réalisée avec la protéine recombinante gp120 et l'héparine puis le dp12. Dans un premier temps, gp120 seule (3,5 μ M) est incubée avec l'héparine activée puis digérée et les complexes sont purifiés puis séquencés. Cela permet d'analyser les HBD de gp120 dans sa conformation non liée à CD4 (CD4i n'est pas formé). Puis, l'héparine activée est ajoutée à des complexes gp120/CD4 (3,5/3,5 μ M), afin d'étudier les sites de fixation à l'héparine potentiellement créés ou démasqués lors de l'interaction avec CD4. Comme pour RANTES (9-68), la formation des complexes héparine/gp120 est vérifiée par Western Blot, avant protéolyse, puis l'élution des complexes lors de la purification sur la résine de DEAE est suivie par Dot-Blot (résultats non montrés). La fixation de gp120 sur l'héparine activée avoisine les 100% et les complexes sont élués dans le tampon 1 M NaCl. A une concentration de 3,5 μ M de gp120, trois séquences sont détectées (figure 81) : ¹⁶⁵IRGKVQKEYAFFY¹⁷⁷, où la Lys¹⁶⁸ (et peut-être la Lys¹⁷¹) est engagée dans le couplage, appartient à la boucle V1/V2, ²⁹²VEINCTRPNNNTRKRIR³⁰⁸ (Lys³⁰⁵ engagée) correspond à la base hyperbasique de V3 et ⁴⁹⁶VAPTKAKRR⁵⁰⁴, un peptide de la partie C-terminale (domaine C5), où la Lys⁴⁹⁹ (et peut-être la Lys⁵⁰¹) est engagée dans le couplage. Chacun des

peptides séquencés contient un motif consensus d'interaction avec l'héparine, constitué de résidus basiques (surligné en jaune, figure 81B). Des résultats préliminaires issus d'une unique expérience réalisée avec 500 nM de gp120 ont, en revanche, conduit à l'identification de seulement deux des HBD (boucle V3 et domaine C5), suggérant que l'HBD de la boucle V1/V2 pourrait constituer un site d'interaction de plus faible affinité (résultats non présentés). Ces données restent néanmoins à confirmer par des expériences ultérieures.

A

*MRVKEKYQHLWRWGW***RWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEV**
 HNVWATHACVPTDPNPQEVVLNVNVTENFNMW**KNDMVEQM**HEDIISLWDQSL**KPCVKLTPLCVSLK**
 CTDL**KNDTNTN**SSSGRMIME**KGEIKNCSFNISTSI****IRGKVQKEYAFFYKLDI**IPIDNDTTSYKLTS
 CNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAIL**KCNNKTFNGTG**PCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLL
 LNGLAEEEEVVIRSVNFTDNAKTIIIVQLNTSVEINCT**RPNNNTRKRIR**IQRGPGRFVTIGKIGN
 MRQAHCNIS**RAKWNNTL**KQIAS**KLREQFGNNKTI**IF**KQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYC**NSTQL
 FNSTWFNSTWSTEGSNNTSGSDTITLPCRIKQIINMWQ**KVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLT**
 RDGGNSNNESEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPT**KAKRRVVQREKR**

B

(i)

IRGKVQKEYAFFYKLDI
 VEINCT**RPNNNTRKRIR**IQ
 VAPT**KAKRRV**

(ii)

IRGKVQKEYAFFY
 VEINCT**RPNNNTRKRIR**
 VAPT**KAKRR**

*MRVKEKYQHLWRWGW***RWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEV**
 HNVWATHACVPTDPNPQEVVLNVNVTENFNMW**KNDMVEQM**HEDIISLWDQSL**KPCVKLTPLCVSLK**
 CTDL**KNDTNTN**SSSGRMIME**KGEIKNCSFNISTSI****IRGKVQKEYAFFYKLDI**IPIDNDTTSYKLTS
 CNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAIL**KCNNKTFNGTG**PCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLL
 LNGLAEEEEVVIRSVNFTDNAKTIIIVQLNTSVEINCT**RPNNNTRKRIR**IQRGPGRFVTIGKIGN
 MRQAHCNIS**RAKWNNTL**KQIAS**KLREQFGNNKTI**IF**KQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYC**NSTQL
 FNSTWFNSTWSTEGSNNTSGSDTITLPCRIKQIINMWQ**KVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLT**
 RDGGNSNNESEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPT**KAKRRVVQREKR**

Figure 81 : analyse des domaines de fixation à l'héparine de gp120

(A) Séquence protéique de gp120. Les lysines et les arginines sont représentées en gras et le peptide signal est noté en italique. (B) Analyse des peptides se liant à l'héparine, détectés avec 3,5 µM de protéine. (i) et (ii) sont le résultat des deux expériences indépendantes. Les acides aminés impliqués dans le couplage avec l'héparine sont représentés en rouge et les résidus partagés par plusieurs séquences sont notés en rose. Les résultats obtenus sont reportés sur la séquence complète de gp120 (en gris).

Cette méthode, appliquée ensuite à des complexes gp120/CD4, ne permet d'identifier aucun site d'interaction supplémentaire avec l'héparine (figure 82). Seuls les trois peptides séquencés à partir de gp120 non complexée à CD4 sont à nouveau retrouvés. Les séquences identifiées sont relativement longues (figure 82B (i)), ce qui peut laisser penser que la digestion par la thermolysine est partielle (sites de coupure peu accessibles et/ou quantité d'enzyme trop faible). L'expérience est donc reconduite en ajoutant une étape de dénaturation

(β -mercaptoéthanol et urée, à 60°C – cf matériel et méthodes) préalablement à la digestion protéolytique et la quantité d'enzyme est triplée. La digestion est alors complète, il en résulte des peptides plus courts (figure 82B (ii)), mais aucune nouvelle séquence n'est identifiée.

Il est intéressant de noter que, dans les deux expériences indépendantes réalisées ((i) et (ii)), la méthode permet d'identifier, à chaque fois, deux séquences chevauchantes appartenant à la boucle V3 qui ne débutent pas au même résidu : ²⁹²VEINCTRPNNNTRKRIR³⁰⁸ et ²⁹⁶CTRPNNNTRKR³⁰⁸. Ces séquences correspondent à la partie N-terminale de la boucle V3 et on peut envisager que l'interaction gp120/CD4 induit le déplacement de la boucle V3 qui devient alors plus sensible à la protéolyse (meilleure accessibilité de la thermolysine), d'où la présence du peptide commençant par la Cys²⁹⁶. Dans ce sens, plusieurs études ont montré que la fixation de CD4 sur gp120 augmentait le clivage protéolytique de la boucle V3^{825,826}.

A

*MRVKEKYQHLWRWGWRTMMLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEV
HNWATHACVPTDPNPQEVVLNVNVTENFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLK
CTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDNDTTSYKLT
CNTSVITQACPKVSFEPPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLL
LNGSLAEEEVVIRSVNFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGN
MRQAHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSQTL
FNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRKQIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLT
RDGGNSNNESEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRRVQREKR*

B

(i)

IRGKVQKEYAFFYKLDI
CTRPNNNTRK
VEINCTRPNNNTRKRIR
VAPTAKRRV

(ii)

IRGKVQKEY
CTRPNNNTRKR
VEINCTR
VAPTAK

*MRVKEKYQHLWRWGWRTMMLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEV
HNWATHACVPTDPNPQEVVLNVNVTENFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLK
CTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDNDTTSYKLT
CNTSVITQACPKVSFEPPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLL
LNGSLAEEEVVIRSVNFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGN
MRQAHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSQTL
FNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRKQIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLT
RDGGNSNNESEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRRVQREKR*

Figure 82 : analyse des HBD de gp120 préincubée avec CD4

(A) Séquence protéique de gp120. Les lysines et les arginines sont représentées en gras et le peptide signal est noté en italique. (B) Analyse des peptides se liant à l'héparine, détectés avec 3,5 μ M de protéine. (i) et (ii) sont le résultat des deux expériences indépendantes. Les acides aminés impliqués dans la fixation à l'héparine sont représentés en rouge. Les résultats obtenus sont reportés sur la séquence complète de gp120 (en gris).

⁸²⁵ Sattentau, Q. J. and Moore, J. P. (1991) *J Exp Med* **174** (2), 407-415

⁸²⁶ Clements, G. J., Price-Jones, M. J., Stephens, P. E., Sutton, C., Schulz, T. F., Clapham, P. R., McKeating, J. A., McClure, M. O., Thomson, S., Marsh, M. and et al. (1991) *AIDS Res Hum Retroviruses* **7** (1), 3-16

Ces résultats nous ont conduits à postuler que l'héparine pourrait être trop longue pour pouvoir accéder à l'épitope CD4i, exposé suite à l'interaction avec CD4. En effet, deux des HBD identifiés se situent sur les boucles V1/V2 et V3, qui encadrent la région CD4i. Ainsi, il est possible que l'héparine ponte ces deux HBD et ne puisse plus interagir avec CD4i. Pour vérifier cette hypothèse, les expériences sont réalisées en remplaçant l'héparine par un dp12 (environ 4 à 5 fois plus court que l'héparine). Cependant, dans ces conditions, l'analyse des HBD de gp120 seule ou complexée à CD4 a conduit à l'identification des trois mêmes HBD que précédemment.

Ainsi, la technique d'analyse des HBD en solution, tout d'abord validée grâce à l'étude de la chimiokine RANTES (9-68), a conduit à l'identification, au sein de gp120, de trois domaines d'interaction avec l'héparine. En revanche, aucun résidu du site CD4i n'a, à l'heure actuelle, pu être caractérisé, par cette méthode, pour son engagement dans la fixation à l'héparine ou à un oligosaccharide d'héparine (dp12). Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats consisterait à envisager que les complexes gp120/CD4 ne sont pas stables dans les conditions utilisées et que, de ce fait, gp120 existe majoritairement sous forme non liée à CD4 (cf discussion).

DISCUSSION GENERALE

Plus de 20 ans après l'apparition du SIDA, l'épidémie est loin d'être enrayée et se développe encore de façon dramatique, en particulier dans les pays d'Afrique. La lutte anti-VIH est un enjeu majeur de santé publique. Depuis que la trithérapie a montré ses limites face à l'élimination définitive du virus du fait de la persistance de réservoirs viraux, les recherches s'orientent vers de nouvelles voies d'inhibition du virus, notamment celles se situant en amont de la pénétration du virus dans les cellules cibles.

Le VIH interagit avec deux récepteurs successifs, à la surface des cellules : l'interaction avec le récepteur CD4 induit un changement de conformation de la protéine virale gp120, conduisant à la formation d'un nouvel épitope, CD4i, qui va à son tour se fixer à un récepteur de la famille des chimiorécepteurs (majoritairement CCR5 ou CXCR4). Ceci conduit à une réorganisation des complexes protéiques gp120/gp41 et à l'initiation de la fusion des membranes virale et cellulaire. Le VIH peut également utiliser d'autres récepteurs, à la surface cellulaire, qui jouent souvent un rôle de récepteurs d'attachement ou d'internalisation du virus. Parmi ceux-ci, les héparanes sulfate (HS) permettent au virus de s'adsorber sur les cellules et semblent faciliter l'interaction du virus avec CD4 et les corécepteurs. Les HS sont des chaînes polysaccharidiques linéaires et complexes, fixées à un core protéique (pour former un protéoglycane à chaînes d'HS ou HSPG) souvent ancré dans la membrane des cellules. La majorité des cellules possèdent des HS. Situés à l'interface entre la cellule et la matrice extracellulaire, les HS participent à plusieurs processus cellulaires importants : contrôle de la migration, de l'adhésion et de la différenciation cellulaires, établissement de gradients chimiotactiques, contrôle de la coagulation et du métabolisme des lipides, maintien de l'hydratation de la matrice...

Par ailleurs, de nombreux pathogènes, dont le VIH, ont développé la capacité d'utiliser les chaînes polysaccharidiques des HSPG comme site d'ancrage sur la cellule. Le taux d'expression des HSPG varie en fonction du type cellulaire. En particulier, les cellules cibles du VIH expriment des quantités d'HS différentes⁸²⁷. Les lymphocytes T primaires, quel que soit leur état de maturation, possèdent une faible quantité d'HS, alors que les lignées lymphocytaires expriment des quantités d'HS bien plus importantes que les cellules primaires. Les monocytes expriment également peu d'HS, alors que les macrophages (différenciés à partir des monocytes) expriment généralement des quantités un peu plus fortes. Par ailleurs, les cellules endothéliales et épithéliales, non permissives pour la réplication du VIH, possèdent un fort taux d'HS à leur surface. Ainsi, le rôle des HS dans l'infection par le VIH

⁸²⁷ Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2001) *J Virol* **75** (19), 9187-9200

varie potentiellement en fonction du type cellulaire considéré et, parfois, de l'état de maturation des cellules.

Les HS interagissent avec la protéine virale gp120 du VIH au niveau de la boucle V3 et du site CD4i, qui est aussi le domaine de fixation aux corécepteurs. Mes travaux de thèse ont consisté à caractériser l'interaction HS/CD4i et à déterminer les résidus protéiques engagés. Des études de modélisation moléculaire ont défini quatre résidus basiques de l'épitope CD4i susceptibles d'interagir avec les HS : K121, R419, K421 et K432. Dans ce contexte, nous nous sommes principalement attachés à étudier ces quatre acides aminés : des formes de gp120 mutées sur ces résidus ont été clonées, produites en cellules d'insectes, par infection avec des baculovirus recombinants, puis purifiées en trois étapes.

L'interaction entre le site CD4i des gp120 sauvage ou mutées et l'héparine a ensuite été analysée par deux approches différentes :

- Etude d'interactions par BIAcore,
- analyse des domaines de fixation de gp120 (HBD) sur des billes fonctionnalisées avec des chaînes d'héparine ou de l'héparine en solution.

La première approche nous a permis de valider l'implication de trois des résidus (R419, K421 et K432) dans l'interaction avec l'héparine, l'arginine 419 et la lysine 421 constituant probablement des sites de forte affinité pour l'héparine et la lysine 432, un résidu de plus faible affinité. La lysine 121 ne semble, en revanche, pas participer à la fixation du polysaccharide. Par ailleurs, l'analyse des HBD de gp120 a permis de confirmer que la boucle V3 interagit avec l'héparine. Deux autres domaines d'interaction ont été observés : au niveau de la boucle V1/V2 et dans la partie C-terminale de gp120. En revanche, la participation de CD4i dans la fixation du polysaccharide n'a, à l'heure actuelle, pas été validée par cette méthode.

I- PRODUCTION ET PURIFICATION DE GP120

I-1. Choix du système d'expression

Classiquement, les protéines recombinantes peuvent être exprimées dans quatre systèmes principaux : le système bactérien, les levures, les cellules d'insectes ou les cellules de mammifères. Certaines protéines sont également produites dans des plantes ou des animaux transgéniques.

Les **bactéries** du type *Escherichia coli* permettent de produire des protéines à faible coût. Cependant, leur utilisation est souvent limitée à la production de protéines simples, qui ne requièrent pas de modifications post-traductionnelles et de repliement élaboré dans l'espace. Les **levures** (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) ont les mêmes avantages que les bactéries mais produisent des protéines possédant des modifications post-traductionnelles. Les **cellules de mammifères** représentent le système standard de production de protéines recombinantes complexes (anticorps, par exemple). Elles présentent, néanmoins, un faible rendement. Les **cellules d'insectes** constituent une bonne alternative aux cellules de mammifères. Les modifications post-traductionnelles s'approchent de celles réalisées par les cellules de mammifères (même s'il subsiste des différences – cf figure 84) et le rendement de production est plus élevé. Les **plantes transgéniques** peuvent fabriquer des protéines recombinantes en quantités très importantes. Néanmoins, elles créent des modifications post-traductionnelles spécifiques des plantes et fortement immunogènes pour l'homme. Les **animaux transgéniques** représentent une solution alternative pour produire en grande quantité (dans le lait par exemple) des protéines thérapeutiques complexes, correctement glycosylées et repliées. Leurs coûts sont plus faibles que ceux des systèmes cellulaires. En revanche, ils posent des problèmes de sécurité liés aux éventuelles contaminations virales.

Plusieurs laboratoires se sont intéressés à la production de gp120 (et/ou gp160) et divers systèmes d'expression ont été testés. L'expression de gp120 (ou de fragments de gp120) en bactéries a notamment été développée, essentiellement pour concevoir des méthodes de diagnostic peu onéreuses. En effet, la protéine produite dans ces conditions est immunoréactive vis-à-vis d'un panel d'anticorps présents dans le sérum de patients séropositifs^{828,829,830} (non exhaustif). Cependant, elle n'est pas glycosylée et ne fixe pas CD4⁸³¹ ; ce système n'est donc pas adapté à notre étude. Certains essais ont été réalisés avec des levures, également dans le but de mettre au point des tests de diagnostic sérologique^{832,833,834}. Néanmoins, la forme produite est également non glycosylée.

Le rôle principal des glycosylations de gp120 semble consister à protéger les sites conservés de la protéine afin de permettre au virus d'échapper à la surveillance immunitaire.

⁸²⁸ Samuel, K. P., Seth, A., Zweig, M., Showalter, S. D. and Papas, T. S. (1988) *Gene* **64** (1), 121-134

⁸²⁹ Sohn, M. J., Lee, M. E., Park, H. S., Nham, S. U. and Lee, Y. I. (1996) *J Biotechnol* **45** (3), 211-216

⁸³⁰ Bi, L., Lei, X. and Zhu, J. (1998) *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **12** (2), 136-138

⁸³¹ Morikawa, Y., Moore, J. P. and Jones, I. M. (1990) *J Virol Methods* **29** (1), 105-113

⁸³² Haigwood, N. L., Shuster, J. R., Moore, G. K., Lee, H., Skiles, P. V., Higgins, K. W., Barr, P. J., George-Nascimento, C. and Steimer, K. S. (1990) *AIDS Res Hum Retroviruses* **6** (7), 855-869

⁸³³ Madaule, P., Gairin, J. E., Benichou, S. and Rossier, J. (1991) *FEMS Microbiol Immunol* **3** (2), 99-107

⁸³⁴ Liu, W. F., Gao, D. and Wang, Z. N. (1998) *Clin Diagn Lab Immunol* **5** (4), 592-594

En effet, des travaux ont montré que des virus SIV mutants, dépourvus de N-glycosylations, sont plus immunogènes que des virus sauvages⁸³⁵. Il est donc essentiel de produire gp120 dans un système capable de générer des glycosylations complexes. C'est pourquoi gp120 est classiquement exprimée en cellules de mammifères ou d'insectes. Dans ces deux systèmes, la voie de synthèse des N-glycanes débute de la même façon (figure 84), puis diffère, pour générer des structures plus simples chez les insectes (sans galactose ni acide sialique et mono- ou di-fucosylées sur le GlcNAc de départ). Cela peut s'expliquer par l'absence des enzymes nécessaires à la synthèse et/ou par l'absence d'acide sialique-CMP, le substrat pour la sialylation.

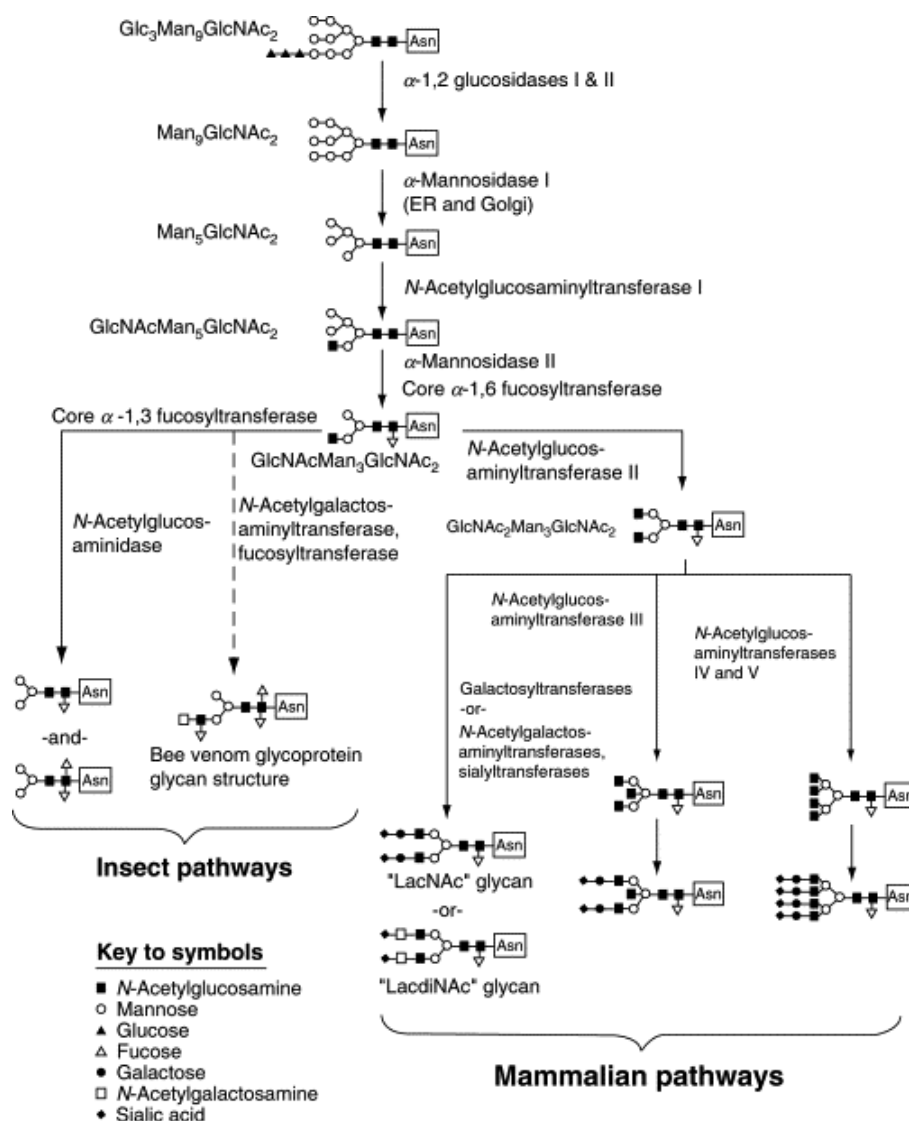


Figure 83: comparaison des voies de glycosylation chez les insectes et les mammifères⁸³⁶

Les structures glycaniques réalisées par les insectes sont moins complexes que celles créées chez les mammifères. En particulier, les N-glycosylations produites par les insectes ne possèdent pas de galactose ni d'acide sialique.

⁸³⁵ Reitter, J. N. and Desrosiers, R. C. (1998) *J Virol* **72** (7), 5399-5407

⁸³⁶ Harrison, R. L. and Jarvis, D. L. (2006) *Adv Virus Res* **68**, 159-191

Ces différences peuvent être problématiques dans le cas de production de protéines à usage thérapeutique. En effet, les acides sialiques terminaux protègent les glycoprotéines de l'élimination plasmatique (*blood clearance*) et augmentent ainsi l'efficacité thérapeutique de protéines injectées dans le sang^{837,838}. De même, les différences de fucosylation observées entre les systèmes de cellules d'insectes et de mammifères sont à prendre en compte dans le cas de protéines à usage thérapeutique. En effet, deux types de fucosylation sont observés chez l'insecte : des mono-fucosylations, aussi présentes chez les mammifères, et des di-fucosylations, absentes des N-glycanes des mammifères⁸³⁹. Ce fucose supplémentaire constitue un problème potentiel puisqu'il représente un épitope allergène chez les espèces mammifères et entraîne ainsi une réponse immunogène. Néanmoins, ces problèmes ne concernent pas la protéine gp120 étudiée au laboratoire puisqu'elle n'est pas produite dans un but thérapeutique. L'un ou l'autre des systèmes peut donc être envisagé.

De nombreux travaux décrivent la production de gp120 en cellules de mammifères (classiquement, des CHO). La protéine est alors produite à raison de 0,1 à 4 mg/L de milieu de culture ; elle est glycosylée et fonctionnelle^{840,841}. Plusieurs équipes se sont également intéressées à la production de gp120 en cellules d'insectes : soit par transfection d'un plasmide d'expression dans des cellules S2 de drosophiles^{842,843,844,845}, soit par infection de cellules d'insectes *via* un baculovirus recombinant possédant le gène codant pour gp120^{846,847,848}.

Notre laboratoire s'est basé sur ces différents travaux pour mettre au point un système de production de gp120. Les deux méthodes (cellules S2 ou baculovirus) ont été développées en parallèle. Au départ, nous nous sommes orientés vers la transfection de cellules S2 car les travaux de Kwong⁸⁴⁹ ont permis d'élucider la structure de la protéine gp120 produite dans ce

⁸³⁷ Kurschat, P., Graeve, L., Erren, A., Gatsios, P., Rose-John, S., Roeb, E., Tschesche, H., Koj, A. and Heinrich, P. C. (1995) *Eur J Biochem* **234** (2), 485-491

⁸³⁸ Grossmann, M., Wong, R., Teh, N. G., Tropea, J. E., East-Palmer, J., Weintraub, B. D. and Szkudlinski, M. W. (1997) *Endocrinology* **138** (1), 92-100

⁸³⁹ Staudacher, E., Altmann, F., Wilson, I. B. and Marz, L. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1473** (1), 216-236

⁸⁴⁰ Chen, B., Zhou, G., Kim, M., Chishti, Y., Hussey, R. E., Ely, B., Skehel, J. J., Reinherz, E. L., Harrison, S. C. and Wiley, D. C. (2000) *J Biol Chem* **275** (45), 34946-34953

⁸⁴¹ Jeffs, S. A., Goriup, S., Keble, B., Crane, D., Bolgiano, B., Sattentau, Q., Jones, S. and Holmes, H. (2004) *Vaccine* **22** (8), 1032-1046

⁸⁴² Angelichio, M. L., Beck, J. A., Johansen, H. and Ivey-Hoyle, M. (1991) *Nucleic Acids Res* **19** (18), 5037-5043

⁸⁴³ Culp, J. S., Johansen, H., Hellmig, B., Beck, J., Matthews, T. J., Delers, A. and Rosenberg, M. (1991) *Biotechnology (N Y)* **9** (2), 173-177

⁸⁴⁴ Ivey-Hoyle, M., Culp, J. S., Chaikin, M. A., Hellmig, B. D., Matthews, T. J., Sweet, R. W. and Rosenberg, M. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (2), 512-516

⁸⁴⁵ Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

⁸⁴⁶ Murphy, C. I., McIntire, J. R., Davis, D. R., Hodgdon, H., Seals, J. R. and Young, E. (1993) *Protein Expr Purif* **4** (5), 349-357

⁸⁴⁷ Yeh, J. C., Seals, J. R., Murphy, C. I., van Halbeek, H. and Cummings, R. D. (1993) *Biochemistry* **32** (41), 11087-11099

⁸⁴⁸ Misse, D., Cerutti, M., Schmidt, I., Jansen, A., Devauchelle, G., Jansen, F. and Veas, F. (1998) *J Virol* **72** (9), 7280-7288

⁸⁴⁹ Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393** (6686), 648-659

système. De plus, les travaux de Ivey-Hoyle *et al.* annonçaient des taux de production variant de 5 à 35 mg/L de milieu de culture. Néanmoins, dans notre cas, le taux de protéine sécrétée avoisinerait plutôt 0,5 à 1 mg/L. En revanche, les taux de production que nous avons obtenus en infectant des cellules Sf21 avec des baculovirus recombinants approcheraient 25 à 30 mg/L de milieu de culture. Ce système a donc été retenu pour la production des différentes formes mutées de gp120.

I-2. Choix de la séquence signal d'excrétion

Toutes les glycoprotéines virales sont sécrétées. Elles sont synthétisées par des polyribosomes liés à la membrane, sous la forme d'un précurseur possédant une extension N-terminale de 15 à 30 résidus : le peptide signal. Cette séquence participe à la sécrétion de la protéine, en dirigeant sa translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique, puis est clivée par des peptidases spécifiques. Ces séquences signal ne présentent pas d'homologie de séquence mais certains éléments structuraux sont systématiquement observés : une région riche en acides aminés chargés positivement, un cœur hydrophobe et une région C-terminale polaire suivie du site de clivage^{850,851}. Des études de mutagenèse ont permis de montrer que l'intégrité du cœur hydrophobe est nécessaire à l'initiation de la sécrétion. De même, les acides aminés chargés positivement semblent jouer un rôle crucial dans le mécanisme d'excrétion.

Plusieurs laboratoires ont étudié l'importance du peptide signal dans le taux de protéine sécrétée (système d'expression baculovirus).

La protéine gp120 possède une séquence signal d'excrétion endogène. Il a été montré que ce peptide signal était responsable d'une faible expression et sécrétion⁸⁵². L'étude du peptide synthétisé dans le système baculovirus a montré qu'il était constitué d'un long domaine hydrophobe inhabituel, précédé d'une région très basique. La substitution de la totalité du peptide signal par différentes séquences signal a permis d'améliorer sensiblement les taux de production. En particulier, les peptides signal de la glycoprotéine gD du virus de l'Herpès ou du tPA humain (*human tissue plasminogen activator*) ont montré une augmentation du taux d'expression et de sécrétion de gp120^{852,853,854}. De la même façon, les séquences signal de la melittine (protéine du venin d'abeille) et de l'interleukine-3 murine

⁸⁵⁰ Perlman, D. and Halvorson, H. O. (1983) *J Mol Biol* **167** (2), 391-409

⁸⁵¹ von Heijne, G. (1983) *Eur J Biochem* **133** (1), 17-21

⁸⁵² Lasky, L. A., Groopman, J. E., Fennie, C. W., Benz, P. M., Capon, D. J., Dowbenko, D. J., Nakamura, G. R., Nunes, W. M., Renz, M. E. and Berman, P. W. (1986) *Science* **233** (4760), 209-212

⁸⁵³ Berman, P. W., Nunes, W. M. and Haffar, O. K. (1988) *J Virol* **62** (9), 3135-3142

⁸⁵⁴ Culp, J. S., Johansen, H., Hellmig, B., Beck, J., Matthews, T. J., Delers, A. and Rosenberg, M. (1991) *Biotechnology (N Y)* **9** (2), 173-177

sont associées à une amélioration des taux de protéine gp120 produite⁸⁵⁵. Contrairement au peptide signal de gp120 qui contient 5 résidus basiques, la séquence signal de la melittine en possède un et celle de l'IL-3, aucun. Ces observations ont conduit à étudier le rôle des acides aminés chargés positivement par mutagenèse. La substitution d'un ou plusieurs de ces acides aminés par des résidus non chargés augmente considérablement les taux d'expression et de sécrétion de gp120⁸⁵⁵. En revanche, muter simultanément les 5 résidus a conduit à abolir la synthèse de la protéine sous sa forme glycosylée. Dans ce cas, la protéine non glycosylée s'accumule dans les cellules. Il existe ainsi un nombre minimum de résidus basiques requis pour une translocation efficace à travers la membrane du réticulum endoplasmique.

De la même façon, Golden *et al.*, en 1998⁸⁵⁶, ont comparé 3 séquences signal : celle du tPA, de la pap (human placental alkaline phosphatase) et de gp67 (une glycoprotéine d'enveloppe du baculovirus). Ils ont montré que le peptide signal du tPA permettait d'obtenir le plus fort taux de gp120 sécrétée, suivi de celui de gp67 puis de la pap.

Enfin, les travaux de Murphy *et al.*, en 1993, ont visé la comparaison du peptide signal de gp120 avec ceux d'egt et de gp67, deux protéines du baculovirus. Dans cette étude, les taux de protéine produite et sécrétée étaient, encore une fois, supérieurs (de 20 à 30 fois) en modifiant la séquence signal endogène.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à comparer deux peptides signal : celui d'egt, régulièrement cité dans différentes études^{857,858}, et celui de la melittine, présentant de bons taux d'expression pour différentes protéines produites au laboratoire, notamment : les L- et H-ficolines⁸⁵⁹, ainsi que MASP-1 et MASP-2⁸⁶⁰. Aucune différence notable entre ces deux séquences signal n'a été détectée au niveau des taux de production et de sécrétion de gp120. En revanche, nous avons observé des différences considérables dans les profils de migration sur gel SDS-PAGE des protéines, en fonction du type cellulaire utilisé pour les produire (cf ci-dessous).

⁸⁵⁵ Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y. and Kang, C. Y. (1994) *Virology* **204** (1), 266-278

⁸⁵⁶ Golden, A., Austen, D. A., van Schravendijk, M. R., Sullivan, B. J., Kawasaki, E. S. and Osburne, M. S. (1998) *Protein Expr Purif* **14** (1), 8-12

⁸⁵⁷ Murphy, C. I., McIntire, J. R., Davis, D. R., Hodgdon, H., Seals, J. R. and Young, E. (1993) *Protein Expr Purif* **4** (5), 349-357

⁸⁵⁸ Misse, D., Cerutti, M., Schmidt, I., Jansen, A., Devauchelle, G., Jansen, F. and Veas, F. (1998) *J Virol* **72** (9), 7280-7288

⁸⁵⁹ Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J. C., Arlaud, G. J., Thielens, N. M. and Gaboriaud, C. (2007) *Embo J* **26** (2), 623-633

⁸⁶⁰ Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N. M., Jensenius, J. C. and Arlaud, G. J. (2001) *J Biol Chem* **276** (44), 40880-40887

I-3. Choix du type cellulaire

Classiquement, gp120 est produite en infectant des cellules issues de tissu ovarien de larves du papillon *Spodoptera frugiperda* (Sf21 ou Sf9, Sf9 étant une lignée dérivée de la souche Sf21). Néanmoins, l'utilisation de cellules High Five (HF), extraites d'œufs de *Trichoplusia ni*, semble induire une augmentation du taux de production de nombreuses protéines, notamment les protéines glycosylées et sécrétées (jusqu'à 25 fois plus de production que dans les Sf9). Cette observation a été confirmée au laboratoire pour différentes protéines (Evelyn Gout, communication personnelle). De plus, certains travaux ont montré la présence de galactose dans les structures saccharidiques des protéines produites dans ces cellules, se rapprochant ainsi des N-glycosylations réalisées par les cellules de mammifères^{861,862}. Néanmoins, d'autres études n'ont détecté aucun groupement Gal⁸⁶³. Par ailleurs, un nouveau type cellulaire a été développé par Invitrogen : il s'agit des Mimic Sf9, une lignée dérivée des Sf9. Ces cellules ont été modifiées pour exprimer cinq glycosyltransférases de mammifères (la α 2,6-sialyltransférase, la α 2,3-sialyltransférase (exprimée mais inactive), la β 4-galactosyltransférase, ainsi que la N-acétylglucosaminyltransférase et la N-acétylglucosaminyltransférase II), afin de produire des protéines avec un profil de glycosylation plus proche de celui réalisé en cellules de mammifères (N-glycanes bi-antennaires sialylés).

Nous avons donc voulu tester ces quatre types cellulaires pour produire gp120. Les Mimic Sf9 (transformées pour exprimer les enzymes responsables de la sialylation) expriment et sécrètent très faiblement gp120. En revanche, les cellules Sf9, Sf21 et HF produisent gp120 en quantité importante. En particulier, nous avons observé une augmentation du taux de protéine produite dans les HF (estimée à 15 fois). La protéine ainsi produite présente, néanmoins, un profil de migration électrophorétique très hétérogène : le poids moléculaire apparent de gp120 varie de 60 kDa à 120 kDa. Après traitement à la N-glycosidase, la protéine déglycosylée présente une masse moléculaire homogène d'environ 60 kDa (figure 43), suggérant une forte hétérogénéité de glycosylation dans ce système. Ces résultats sont assez inattendus puisque les HF réalisent les mêmes modifications post-traductionnelles que les cellules Sf, voire même légèrement plus élaborées (ajout de Gal – controversé). Les cellules Sf21 et Sf9 produisent gp120 dans des quantités similaires et avec

⁸⁶¹ Ogonah, O. W., Freedman, R. B., Jenkins, N. and Rooney, B. C. (1995) *Biochem Soc Trans* **23** (1), 100

⁸⁶² Hsu, T. A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E. M., Fan, J. Q., Lee, Y. C. and Betenbaugh, M. J. (1997) *J Biol Chem* **272** (14), 9062-9070

⁸⁶³ Kulakosky, P. C., Hughes, P. R. and Wood, H. A. (1998) *Glycobiology* **8** (7), 741-745

un profil de migration plus homogène que les HF. Ce résultat était prévisible puisque ces deux lignées cellulaires sont proches (les Sf9 sont dérivées des Sf21). La dégradation de gp120 paraît néanmoins plus importante pour la protéine produite par les Sf9. Ce phénomène n'a jamais été décrit dans la littérature et gp120 est classiquement produite en utilisant indifféremment des Sf9 ou des Sf21. Ces résultats nous ont conduits à choisir les cellules Sf21 pour produire gp120 et ses formes mutées. Ces cellules expriment, en effet, gp120 avec un taux de production satisfaisant, des modifications post-traductionnelles homogènes et gp120 semble subir moins de dégradations protéolytiques dans ces cellules.

I-4. Optimisation des conditions de purification

Il n'existe pas de protocole standard pour la purification de gp120 et les méthodes les mieux décrites dans la littérature sont la chromatographie d'affinité (souvent basée sur l'affinité de gp120 pour un anticorps et/ou pour une lectine) et la chromatographie d'exclusion. Certains travaux ont décrit la purification de gp120 sur une résine fonctionnalisée avec du CD4⁸⁶⁴ : bien que cette méthode présente l'avantage de purifier directement des protéines gp120 fonctionnelles, des molécules de CD4 sont éluées conjointement à gp120 et pourraient interférer avec nos études SPR. Pour les mêmes raisons, nous avons rejeté l'idée de purifier gp120 sur une colonne d'héparine.

Lors de notre étude, gp120 a été purifiée en trois étapes successives de purification : une chromatographie échangeuse de cations, une chromatographie basée sur l'affinité de gp120 pour la lentil-lectine et une chromatographie d'exclusion. Nous avons adapté la première étape d'après les travaux de Culp⁸⁶⁵ qui décrivaient la purification de gp120 sur une résine S-Sépharose (colonne échangeuse de cations avec des groupements méthyl sulfonate), dans un tampon MES, pH 6, 400 mM NaCl. Les premiers tests de purification ont été réalisés avec de la résine SP-sépharose, dans le tampon préconisé par Culp. Puis, le protocole a été optimisé en travaillant avec du tampon HEPES et en augmentant progressivement le pH jusqu'à 8,2 afin de diminuer la fixation non spécifique (le pI de gp120_{HXBc2} est de 10,2). Brièvement, le milieu de culture conditionné a été injecté sur la colonne équilibrée dans du tampon 50 mM HEPES pH 8,2, la colonne rincée dans ce même tampon, puis les protéines accrochées éluées en appliquant un gradient de sel variant de 0 à 500 mM.

⁸⁶⁴ Moritz, D., Dirckx, L., Mous, J. and Schneider, J. (1990) *FEBS Lett* **275** (1-2), 146-150

⁸⁶⁵ Culp, J. S., Johansen, H., Hellmig, B., Beck, J., Matthews, T. J., Delers, A. and Rosenberg, M. (1991) *Biotechnology (N Y)* **9** (2), 173-177

La deuxième étape de purification a été basée sur l'affinité de certaines lectines pour les glycosylations de gp120. De nombreux travaux décrivent la purification de gp120 sur des colonnes de lectines. Ces lectines possèdent une affinité légèrement différente pour certains sucres. Les deux lectines les plus utilisées pour la purification de gp120 sont la concanavaline A (Con A - affinité pour α -D-mannose, α -D-glucose) et la lentil-lectine (affinité pour α -D-mannose, α -D-glucose, mais distingue moins bien les résidus mannosyl des résidus glucosyl et fixe, de ce fait, les sucres avec une plus faible affinité que la Con A). Nous avons testé ces deux types de lectines et les résultats ont montré que gp120 s'accrochait à la Con A avec une forte affinité mais que le compétiteur (α -D-méthylmannopyranoside) ne permettait pas d'éluer facilement gp120. En revanche, la purification de gp120 sur une résine de lentil-lectine a donné de bons résultats et a permis d'améliorer considérablement la pureté de l'échantillon issu de la colonne de SP sépharose.

Enfin, l'étape de chromatographie d'exclusion a permis d'éliminer les contaminants résiduels. Le volume d'élution (V_e) de gp120 est de 13,2 mL. La colonne a préalablement été calibrée (résultats non présentés) par injection d'un mélange d'anticorps (150 kDa- V_e =12 mL), de BSA (67 kDa- V_e =14 mL) et d'INF γ (17 kDa- V_e =20 mL). Cela a permis de déterminer que gp120 est éluée comme une espèce d'environ 100 kDa, valeur qui se rapproche de celle observée par migration de gp120 sur un gel SDS-PAGE. En revanche, les protéines contaminantes sont éluées avant gp120 (V_e =7,5-11 mL), alors qu'elles apparaissent comme des protéines de plus faible poids moléculaire, sur un gel SDS-PAGE, en conditions dénaturantes. Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats serait que les protéines résiduelles sont des multimères.

Ce protocole a par la suite dû être optimisé car une protéine de baculovirus était coéluee avec gp120 lors des trois étapes de purification. En effet, l'analyse sur gel SDS-PAGE de l'échantillon purifié faisait apparaître 2 bandes : gp120 à environ 110 kDa et une deuxième protéine à environ 60 kDa. Le séquençage N-terminal de cette protéine a montré qu'il s'agissait d'egt (ecdysteroid UDP-glucosyltransferase), une protéine de baculovirus qui catalyse la conjugaison de stéroïdes circulants avec du glucose ou du galactose. Ce processus inactive les hormones et retarde le processus de mue chez l'insecte. Egt possède 11 kDa de glycosylations, un pI de 7,4 et une affinité pour le glucose de 7 μ M et pour le galactose de 9 μ M. Ces données nous ont conduits à penser que gp120 et egt formaient un complexe. En effet, le pI d'egt suggère que la protéine ne devrait pas se fixer sur la colonne de SP-sépharose. De plus, la chromatographie d'exclusion ne permettait pas de séparer gp120 et

egt. Une étape de lavage de la colonne de SP-sépharose en présence de détergent (0,3% P20), préalablement à l'élution, a permis de décrocher egt.

Ces trois étapes successives ont permis de purifier gp120 avec un degré de pureté estimé à 95%.

II- ANALYSE FONCTIONNELLE DE GP120 SAUVAGE

Les propriétés fonctionnelles de la protéine gp120 produite ont été étudiées par différentes méthodes : des analyses SPR et des expériences d'interaction ou de signalisation avec le récepteur CXCR4, dans un contexte cellulaire.

Les données obtenues avec le BIAcore ont permis de valider la fonctionnalité de gp120. En effet, les résultats ont montré qu'elle interagit avec CD4 ($K_d = 8,5$ nM), immobilisé ou soluble. Non liée à CD4, gp120 n'interagit pas ou peu avec l'anticorps anti-CD4i, 17b. En revanche, la formation de complexes gp120/CD4 induit la fixation de gp120 sur l'anticorps 17b. Ces résultats suggèrent que l'épitope CD4i n'est pas formé dans la conformation native de gp120 et que l'interaction de gp120 avec CD4 entraîne bien le changement conformationnel de gp120 qui aboutit à la formation du site de fixation aux corécepteurs. La protéine gp120 interagit également avec l'héparine. Les données à l'équilibre ont permis de calculer l'affinité de cette interaction : elle est de l'ordre de 40 nM pour gp120 et d'environ 20 nM pour des complexes gp120/CD4, avec 0,7 à 0,9 molécules de gp120 par chaîne d'héparine (6 kDa). Il faut néanmoins noter que, dans les conditions expérimentales appliquées, l'équilibre n'a pas été complètement atteint et, de ce fait, prendre en compte ce paramètre dans l'interprétation des résultats ci-dessus. L'affinité de gp120 pour les HS a été calculée dans les mêmes conditions (52 nM pour gp120 et 31 nM pour gp120-CD4), avec 1,1 à 1,6 molécules de gp120 par chaîne d'HS (15 kDa). Les affinités de gp120 pour l'héparine et les HS sont donc du même ordre de grandeur et augmentent lorsque CD4 est préalablement fixé à gp120. Les chaînes d'HS utilisées étant plus longues que celles d'héparine, le nombre de molécules de gp120 liées par chaîne est plus élevé pour les HS.

Dans une étude antérieure, Moulard *et al.*⁸⁶⁶ ont calculé une affinité de gp120_{HXBc2} pour l'héparine de 220 nM, avec une moyenne de 4,4 molécules de gp120 fixées par chaîne d'héparine. L'héparine utilisée lors de cette étude est de l'héparine de 15 kDa, soit 2 à 3 fois plus longue que celle que nous avons utilisée. Cette distinction pourrait expliquer la

⁸⁶⁶ Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) *J Virol* **74** (4), 1948-1960

différence dans le nombre de molécules de gp120 fixées sur une chaîne. En revanche, l'affinité de gp120 pour l'héparine que nous avons calculé est 5 à 6 fois plus forte. Plus en accord avec nos résultats, Harrop *et al.*⁸⁶⁷, en 1998, ont déterminé un *K_d* d'environ 10 nM. Leurs expériences ont, néanmoins, été réalisées dans un tampon sans NaCl, ce qui peut expliquer la forte affinité calculée.

L'augmentation de l'affinité de gp120 pour l'héparine (ou les HS), en présence de CD4, permet de conclure que le changement de conformation de gp120, induit par CD4, entraîne l'exposition d'un nouveau domaine d'interaction avec l'héparine, probablement l'épitope CD4i. Ces données sont confirmées par le fait que l'héparine inhibe la fixation des complexes gp120/CD4 sur la surface fonctionnalisée avec 17b.

Dans un deuxième temps, la fixation de gp120 à la surface de cellules exprimant CXCR4 a été étudiée de façon indirecte, en analysant la capacité de gp120 à inhiber l'interaction de CXCR4 avec l'anticorps 12G5. Ces expériences d'inhibition ont tout d'abord été réalisées avec la chimiokine SDF-1 α , ligand naturel de CXCR4. L'affinité de SDF-1 α pour CXCR4 est de l'ordre de 3 à 7 nM^{868,869} alors que celle de gp120 pour CXCR4 varie entre 200 et 500 nM, avec un maximum de 500 nM pour la souche HXBc2^{870,871}. En présence de CD4, l'affinité de gp120_{HXBc2} pour le chimiorécepteur d'élève à 200 nM.

Les résultats ont montré qu'une concentration de SDF-1 α de 500 nM était nécessaire pour inhiber totalement la fixation de l'anticorps sur CXCR4. Sachant que l'affinité de gp120/CD4 pour CXCR4 est environ 40 fois plus faible que celle de SDF-1 α , il aurait théoriquement été nécessaire de réaliser la compétition avec 20 μ M de gp120 pour inhiber l'interaction 12G5/CXCR4, des concentrations techniquement impossibles à utiliser pour des raisons de disponibilité de matériel. En revanche, la concentration de 2 μ M utilisée aurait dû permettre de visualiser une inhibition partielle.

Plusieurs études ont néanmoins montré que les expériences d'interaction entre CXCR4 et gp120_{HXBc2} étaient très difficiles à mettre en œuvre pour plusieurs raisons : tout d'abord, comme discuté ci-dessus, l'affinité de gp120 pour CXCR4 est globalement très faible (200 nM contre moins de 10 nM pour gp120/CCR5), particulièrement pour la souche HXBc2

⁸⁶⁷ Harrop, H. A. and Rider, C. C. (1998) *Glycobiology* **8** (2), 131-137

⁸⁶⁸ Hesselgesser, J., Liang, M., Hoxie, J., Greenberg, M., Brass, L. F., Orsini, M. J., Taub, D. and Horuk, R. (1998) *J Immunol* **160** (2), 877-883

⁸⁶⁹ Balabanian, K., Harriague, J., Decrion, C., Lagane, B., Shorte, S., Baleux, F., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. and Chakrabarti, L. A. (2004) *J Immunol* **173** (12), 7150-7160

⁸⁷⁰ Hoffman, T. L., Canziani, G., Jia, L., Rucker, J. and Doms, R. W. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (21), 11215-11220

⁸⁷¹ Babcock, G. J., Mirzabekov, T., Wojtowicz, W. and Sodroski, J. (2001) *J Biol Chem* **276** (42), 38433-38440

(500 nM). Une équipe⁸⁷² a notamment montré que la fixation de gp120_{HXBc2} sur des cellules exprimant CXCR4, en présence de CD4, était si faible, qu'elle ne pouvait être quantifiée (cytométrie en flux et immunorévélation). En revanche, des tests de fusion cellulaire leur ont permis de valider l'interaction de gp120_{HXBc2} avec CXCR4. C'est une expérience envisageable pour étudier la fixation de la protéine gp120 produite au laboratoire. Néanmoins, dans ce cas, il s'agirait plutôt d'expériences d'inhibition de fusion (entre une cellule effectrice exprimant Env (gp120 et p41) et une cellule cible exprimant CD4 et CXCR4) par des complexes gp120_{HXBc2}/CD4 en solution. Il n'est donc pas certain d'aboutir à des résultats concluants. Par ailleurs, des travaux⁸⁷³ ont montré que gp120_{HXBc2} a tendance à s'adsorber à la surface des cellules de façon non spécifique. En effet, la protéine s'attache aussi bien à des cellules CCR5⁺ qu'à des cellules CXCR4⁺. Pour pallier ce problème, cette équipe a développé des protéoliposomes paramagnétiques portant le récepteur CXCR4, qui ont permis de mettre en évidence l'interaction de gp120 et CXCR4.

Ces différents travaux montrent qu'il est difficile de mettre en œuvre des tests cellulaires pour étudier l'interaction gp120_{HXBc2}/CXCR4 et que les résultats obtenus doivent être pris avec précaution. Néanmoins, il ne faut pas exclure que la protéine produite au laboratoire n'interagit pas avec CXCR4. L'absence de signalisation pourrait venir d'une légère différence de glycosylation entre les protéines exprimées dans des cellules d'insectes et celles exprimées chez les mammifères. En effet, certains travaux ont montré l'importance des glycosylations dans le tropisme viral. La protéine gp120 est fortement glycosylée (plus de 50% de sa masse). Ces glycosylations jouent, non seulement, un rôle dans l'échappement du virus à la surveillance du système immunitaire, mais il semble qu'elles influent également sur le tropisme viral (cf bibliographie II-1.2.2.). En effet, plusieurs études ont montré que la présence d'une glycosylation située sur l'Asn301 (dans la boucle V3) était caractéristique des souches R5 (100% contre 36% pour les isolats X4). La protéine gp120 produite au laboratoire, comme la majorité des protéines gp120 appartenant à un virus X4, ne possède pas cette glycosylation. Cela a été vérifié par séquençage N-terminal de la boucle V3 (l'asparagine est séquencée, elle n'est donc pas glycosylée). Les résultats obtenus ne peuvent donc pas être expliqués par ce phénomène. Néanmoins, la majorité des travaux sur l'importance des glycosylations de gp120 ont visé l'analyse de la présence / l'absence de ces glycosylations. A ce jour, très peu d'études ont été orientées vers la structure même des

⁸⁷² Biscone, M. J., Miamidian, J. L., Muchiri, J. M., Baik, S. S., Lee, F. H., Doms, R. W. and Reeves, J. D. (2006) *Virology* **351** (1), 226-236

⁸⁷³ Babcock, G. J., Mirzabekov, T., Wojtowicz, W. and Sodroski, J. (2001) *J Biol Chem* **276** (42), 38433-38440

glycanes. Des travaux⁸⁷⁴ ont cependant montré que les unités osidiques situées à l'extrémité des N-glycanes de gp120 sont des acides sialiques et des galactoses. Or, les cellules d'insectes ne sont pas capables de réaliser ces glycosylations. Ainsi, les glycosylations de gp120 diffèrent lorsque la protéine est produite dans un système d'expression basé sur les cellules d'insectes ou sur les cellules de mammifères. On peut alors envisager que ces différences jouent un rôle dans la reconnaissance du corécepteur.

Deux autres expériences nous ont permis d'étudier, non pas la fixation de gp120 sur CXCR4, mais la signalisation induite par cette interaction : l'étude de la chimiotaxie induite par gp120 et l'étude de la mobilisation du calcium intracellulaire. En effet, certaines études ont montré que la fixation de gp120 sur CXCR4 entraînait l'induction de ces voies de signalisation. D'autres travaux ont, en revanche, montré que cette interaction induisait des réponses incomplètes ou aberrantes^{875,876}.

La fixation de la chimiokine SDF-1 α sur CXCR4 induit l'interaction du chimiorécepteur avec les protéines G α i, la phosphorylation de CXCR4, puis l'internalisation des complexes SDF-1 α /CXCR4. Ces étapes entraînent l'activation de plusieurs voies de signalisation (figure 84) et donc de différents processus biologiques, tels que l'activation du flux de calcium intracellulaire, l'adhésion cellulaire, la régulation de la transcription et la migration cellulaire (ou chimiotaxie). Il semble que ce dernier phénomène résulte de l'activation de plusieurs événements de signalisation complémentaires⁸⁷⁷. En particulier, la libération de calcium influe sur la migration cellulaire. Les deux voies que nous avons étudiées sont donc liées.

⁸⁷⁴ Bolmstedt, A., Olofsson, S., Sjogren-Jansson, E., Jeansson, S., Sjoblom, I., Akerblom, L., Hansen, J. E. and Hu, S. L. (1992) *J Gen Virol* **73** (12), 3099-3105

⁸⁷⁵ Doranz, B. J., Orsini, M. J., Turner, J. D., Hoffman, T. L., Berson, J. F., Hoxie, J. A., Pelper, S. C., Brass, L. F. and Doms, R. W. (1999) *J Virol* **73** (4), 2752-2761

⁸⁷⁶ Brelot, A., Heveker, N., Montes, M. and Alizon, M. (2000) *J Biol Chem* **275** (31), 23736-23744

⁸⁷⁷ Busillo, J. M. and Benovic, J. L. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1768** (4), 952-963

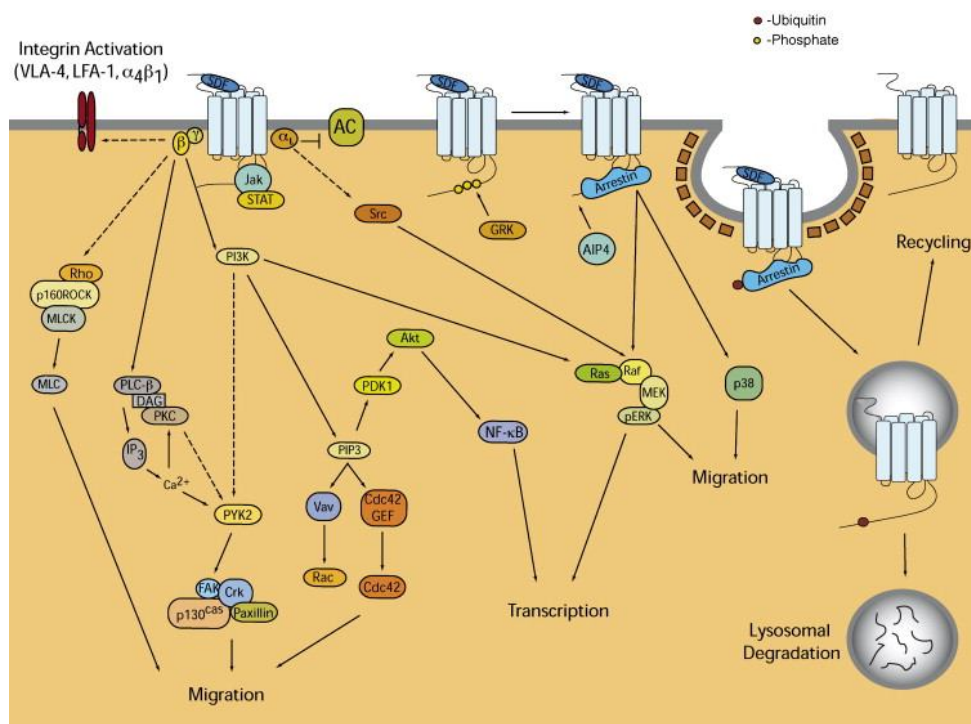


Figure 84 : voies de signalisation et régulation de CXCR4⁸⁷⁸

L'étude des deux voies de signalisation (flux du calcium et migration) a conduit à des résultats concordants : l'interaction de SDF-1 α ou gp120_{LAI} avec CXCR4 permet d'induire ces deux voies alors que gp120_{HXBc2} ne les active pas. En particulier, les concentrations nécessaires pour induire 60% de migration, lors des expériences de chimiotaxie, corrélaient avec les constantes d'affinité connues : 3 nM pour SDF-1 α et 200 nM pour gp120_{LAI}/CD4. Ces résultats se rapprochent également de ceux obtenus par d'autres équipes⁸⁷⁹. En revanche, la protéine gp120_{HXBc2} produite au laboratoire n'a pas permis d'activer ces deux voies de signalisation. Néanmoins, plusieurs études^{880,881} ont montré que la signalisation de CXCR4 (et CCR5) n'est pas nécessairement requise pour l'entrée du virus dans la cellule. En particulier, la mutation de résidus dans les domaines intracellulaires de CXCR4 qui conduit à « découpler » le récepteur et les protéines G (et donc à inactiver les voies de signalisation dépendantes des protéines G, comme l'induction du flux de calcium et la migration cellulaire) n'a pas d'effet sur l'entrée du VIH⁸⁸². Ces travaux suggèrent donc que le VIH utilise CXCR4 (et CCR5) comme un site d'attachement et non pour ses capacités à transduire un signal

⁸⁷⁸ Busillo, J. M. and Benovic, J. L. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1768** (4), 952-963

⁸⁷⁹ Balabanian, K., Harriague, J., Decrion, C., Lagane, B., Shorte, S., Baleux, F., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. and Chakrabarti, L. A. (2004) *J Immunol* **173** (12), 7150-7160

⁸⁸⁰ Alkhatib, G., Liao, F., Berger, E. A., Farber, J. M. and Peden, K. W. (1997) *Nature* **388** (6639), 238

⁸⁸¹ Breloet, A., Heveker, N., Montes, M. and Alizon, M. (2000) *J Biol Chem* **275** (31), 23736-23744

⁸⁸² Doranz, B. J., Orsini, M. J., Turner, J. D., Hoffman, T. L., Berson, J. F., Hoxie, J. A., Peiper, S. C., Brass, L. F. and Doms, R. W. (1999) *J Virol* **73** (4), 2752-2761

cellulaire. Ainsi, il est possible que gp120_{HXBc2} interagisse avec CXCR4 sans induire de signal en aval.

Il faut néanmoins envisager, au vu de ces résultats et de ceux obtenus lors des tests cellulaires de compétition avec 12G5, que la protéine gp120_{HXBc2} produite au laboratoire n'interagisse effectivement pas avec le récepteur CXCR4 et l'hypothèse avancée est celle proposée précédemment, à savoir une différence de glycosylation par rapport à une protéine produite dans un système mammifère.

Ces différents tests cellulaires n'ont donc pas été poursuivis ; ils n'ont en particulier pas été utilisés pour étudier le site CD4i et son interaction avec l'héparine. Pour cela, nous avons réalisé des expériences SPR en utilisant une surface activée avec l'anticorps 17b, utilisé comme mime des corécepteurs, sur lequel gp120_{HXBc2} se fixe efficacement.

III- ETUDE DU SITE CD4I

Dans une stratégie de lutte antivirale, il est important d'étudier le site de fixation aux corécepteurs, afin de pouvoir développer des inhibiteurs de l'entrée virale capables de cibler efficacement cette région. Le site de fixation aux corécepteurs est constitué d'une partie du feuillet intermédiaire (« *bridging sheet* ») de gp120. Un certain nombre d'études basées sur des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de définir les résidus de gp120 impliqués dans la fixation à CCR5^{883,884,885}. Ces résidus sont détaillés en annexe II. Le site de fixation aux corécepteurs est fortement conservé d'une souche de VIH à l'autre. Par ailleurs, une souche de tropisme X4 peut être convertie en une souche R5, simplement en substituant sa boucle V3 par celle d'un virus R5, ceci suggérant que les acides aminés engagés dans la fixation à CXR4 sont les mêmes que ceux identifiés pour CCR5. Les travaux de Rizzuto⁸⁸³ seraient donc valables pour la souche HXBc2. En particulier, les résidus K121, R419, K421 et, à moindre échelle, K432 ont été décrits comme impliqués dans la fixation aux corécepteurs. Parmi eux, K121, R419 et K421 semblent également engagés dans la fixation à l'anticorps 17b, appartenant à la famille des anticorps anti-CD4i qui reconnaissent un épitope au niveau du feuillet intermédiaire, exposé suite à la fixation de CD4. Enfin, les données de modélisation moléculaire obtenues ont proposé que K121, R419, K421 et K432 forment un

⁸⁸³ Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. (1998) *Science* **280** (5371), 1949-1953

⁸⁸⁴ Rizzuto, C. and Sodroski, J. (2000) *AIDS Res Hum Retroviruses* **16** (8), 741-749

⁸⁸⁵ Biscone, M. J., Miamidian, J. L., Muchiri, J. M., Baik, S. S., Lee, F. H., Doms, R. W. and Reeves, J. D. (2006) *Virology* **351** (1), 226-236

site de fixation à l'héparine. Nous avons donc choisi d'étudier ces quatre résidus et de préciser leur engagement dans la fixation à l'héparine.

La première expérience a consisté à étudier, par chromatographie d'affinité, la capacité des différentes protéines mutées à fixer l'héparine. Pour cela, chaque mutant a été injecté sur une résine d'héparine, puis le pourcentage de NaCl nécessaire pour élué chaque espèce a été analysé. Ce pourcentage varie de 0,45 à 0,53 M. Ces différences ne sont pas significatives et les mutants fixent donc l'héparine avec la même affinité. Ainsi, les mutations du site CD4i ne semblent pas affecter l'interaction de gp120 avec l'héparine, lorsque gp120 est dans sa conformation non liée à CD4. Dans ce sens, une expérience similaire réalisée pour étudier l'affinité de mutants de SDF-1 α avec l'héparine⁸⁸⁶ montre des différences significatives : le pourcentage de sel nécessaire varie de 0,85 M NaCl pour élué la forme sauvage à 0,57 M pour élué un double mutant (dont les deux résidus sont impliqués dans la fixation de l'héparine).

Puis, le site CD4i a été étudié par des analyses SPR. Les protéines mutées sur deux résidus ou plus fixent moins bien CD4 et l'héparine que la forme sauvage. Cela suggère que ces multiples mutations affectent peut-être la conformation de gp120. Les résultats obtenus avec ces formes sont donc à prendre avec précaution et ils ne seront pas discutés ici.

La première étape a consisté à valider la capacité des mutants à fixer CD4 et à exposer l'épitope CD4i, afin de vérifier leurs propriétés fonctionnelles. Globalement, les formes mutées fixent CD4 avec une moins grande affinité que gp120 sauvage, ceci suggérant que les mutations influent légèrement sur la conformation de gp120. L'hypothèse avancée consiste à penser que les mutations pourraient augmenter la flexibilité de la boucle V3. En effet, de nombreuses études ont montré que gp120 possède une structure très flexible, notamment *via* sa boucle V3. Certains travaux^{887,888,889} ont suggéré que gp120, à l'état libre (non liée à CD4), oscille entre deux états : une conformation non liée à CD4 et une conformation liée (CD4i exposé). D'autres équipes⁸⁹⁰ supportent, en revanche, un modèle où la forme non liée de gp120 existe sous plus de deux états différents. Ces deux modèles résultent en une exposition transitoire de l'épitope CD4i dans la forme non liée de gp120. Une hypothèse consiste à penser que les mutations réalisées pourraient augmenter la flexibilité de gp120 et, ainsi, favoriser l'exposition de CD4i. Le site de fixation à CD4 pourrait alors être moins accessible.

⁸⁸⁶ Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imberty, A. and Lortat-Jacob, H. (2001) *J Biol Chem* **276** (11), 8288-8296

⁸⁸⁷ Stanfield, R., Cabezas, E., Satterthwait, A., Stura, E., Profy, A. and Wilson, I. (1999) *Structure* **7** (2), 131-142

⁸⁸⁸ Myszkowski, D. G., Sweet, R. W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Wyatt, R., Sodroski, J. and Doyle, M. L. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (16), 9026-9031

⁸⁸⁹ Watabe, T., Kishino, H., Okuhara, Y. and Kitazoe, Y. (2006) *Genetics* **172** (3), 1385-1396

⁸⁹⁰ Yuan, W., Bazick, J. and Sodroski, J. (2006) *J Virol* **80** (14), 6725-6737

Dans ce sens, une étude⁸⁹¹ a montré que l'interaction de gp120 avec 17b diminuait l'affinité de gp120 pour CD4. Néanmoins, le déplacement de l'équilibre entre les différentes formes, s'il existe, reste un phénomène éphémère et l'épitope CD4i n'est globalement pas (ou peu) exposé puisque gp120, seule, interagit très faiblement avec l'anticorps anti-CD4i (17b) et la fixation de CD4 sur gp120 entraîne les changements conformationnels nécessaires à la formation de CD4i. Les mutations réalisées n'affectent pas (ou peu) la fixation de CD4i à 17b. Les mutants R419S, K421S et K432S présentent une fixation sur 17b, en présence de CD4, plus faible que la protéine sauvage ([figure 67](#)), qui pourrait s'expliquer par le fait qu'ils se fixent plus faiblement à CD4 et non que l'épitope CD4i serait altéré. Ces résultats ne sont pas en accord avec les données de Rizzuto *et al.*⁸⁹² qui suggèrent que K121, R419 et K421 sont impliqués dans la fixation à 17b. Néanmoins, ces résultats n'ont pas été obtenus à partir d'expériences SPR, ce qui pourrait expliquer les différences avec nos résultats.

De la même façon que pour CD4, les mutants fixent l'héparine légèrement plus faiblement que la protéine sauvage. L'hypothèse avancée ci-dessus (flexibilité de V3 et exposition transitoire de CD4i) permet également d'expliquer ces résultats. Si la protéine est flexible et expose parfois le domaine CD4i, les mutants (si les résidus mutés sont engagés dans l'interaction avec l'héparine) se fixeront à l'héparine avec une affinité plus faible que la forme sauvage.

Les études SPR ont permis d'identifier que trois résidus (R419, K421 et K432) sur les quatre étudiés sont engagés dans la fixation à l'héparine. L'arginine semble, en particulier, critique pour cette interaction. En effet, l'exposition du site CD4i du mutant R419S (par fixation de CD4 sur gp120), n'engendre pas d'augmentation de l'interaction gp120/héparine, suggérant que le mutant R419S se fixe au polysaccharide uniquement par la boucle V3. En revanche, les mutants K421S et K432S montrent une fixation résiduelle à l'héparine *via* leur domaine CD4i (néanmoins beaucoup plus faible que gp120 sauvage), laissant penser que ces deux résidus sont impliqués dans l'interaction avec l'héparine, mais de façon moins critique que R419. Les expériences d'inhibition de l'interaction CD4i/17b par l'héparine confirment l'importance de l'arginine 419. Le résidu K421 semble, dans ce cas, aussi important que R419 puisque les résultats obtenus pour les deux mutants sont similaires (58 et 62% d'inhibition par l'héparine contre 93% pour gp120 sauvage). Les différentes études SPR ont, en revanche, toutes permis de conclure que le résidu K121 n'interagit pas de façon directe avec l'héparine.

Enfin, des études préliminaires ont permis de définir la taille optimale des

⁸⁹¹ Zhang, W., Godillot, A. P., Wyatt, R., Sodroski, J. and Chaiken, I. (2001) *Biochemistry* **40** (6), 1662-1670

⁸⁹² Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. (1998) *Science* **280** (5371), 1949-1953

oligosaccharides pour inhiber l'interaction gp120/17b. En effet, l'héparine étant une molécule de 22 à 24 disaccharides qui peut se fixer à différents sites sur la même protéine, il était intéressant de définir de façon précise la taille d'un oligosaccharide nécessaire pour entrer en compétition avec 17b. Les résultats ont montré qu'un dp 8-10 réduit l'interaction gp120/17b d'environ 40% et un dp12-14 d'environ 65%. Dans ce sens, des études de modélisation moléculaire antérieures⁸⁹³ suggèrent qu'un octasaccharide constitue la taille minimale permettant une bonne interaction entre CD4i et un oligosaccharide. Par ailleurs, il semble qu'un dp14 pourrait se fixer à la fois sur la boucle V3 et le site CD4i. Ces données de modélisation fournissent ainsi une explication quant aux deux paliers observés (dp8-10 et dp12-14) lors des expériences SPR.

IV- CARACTERISATION DES DOMAINES D'INTERACTION AVEC L'HEPARINE

IV-1. Méthode des billes

La méthode des « billes », développée au laboratoire permet, de façon simple, de localiser les HBD (*Heparin Binding Domains*) d'une protéine. Cette approche repose sur la formation de complexes covalents entre une protéine d'intérêt et des billes fonctionnalisées avec des chaînes d'héparine, suivie d'une digestion protéolytique de la protéine. Les peptides retenus (c'est-à-dire contenant des acides aminés liés de façon covalente à l'héparine) sont identifiés par séquençage N-terminal.

IV-1.1. Méthodologie

La première étape de la méthode consiste à immobiliser la protéine sur des chaînes d'héparine. Pour cela, les groupes carboxyliques de l'héparine sont activés par un mélange d'EDC/NHS, pour former des esters de succinimide. De cette façon, des liaisons covalentes sont formées entre les esters de succinimide de l'héparine et les groupes amines des HBD de la protéine d'intérêt. Cette procédure présente l'avantage de ne pas introduire de bras espaceur entre le polysaccharide et la protéine. En effet, la réaction des amines sur les esters de succinimide se fait de manière directe et limite, de cette façon, le couplage à l'interface

⁸⁹³ Vives, R. R., Imberty, A., Sattentau, Q. J. and Lortat-Jacob, H. (2005) *J Biol Chem* **280** (22), 21353-21357

GAG/protéines. De plus, l'activation de l'héparine est réalisée avant l'incubation avec la protéine ; ainsi, celle-ci n'est jamais en contact avec l'agent couplant et les éventuelles interactions protéines/protéines sont évitées.

La seconde étape consiste à digérer la protéine immobilisée sur l'héparine. Les résultats ont montré que cette étape est cruciale pour la qualité des résultats de séquençage. En effet, une digestion incomplète ou l'utilisation d'enzymes avec une haute spécificité de coupure résultent en la génération de longs peptides, avec une partie N-terminale très éloignée du domaine d'interaction. Dans ce cas, le séquençage N-terminal, qui permet de déterminer un nombre limité de résidus (une quinzaine environ), ne permet pas d'identifier l'HBD. De plus, les digestions partielles génèrent plusieurs fragments intermédiaires, avec des parties N-terminales distinctes mais des séquences se chevauchant. La présence de tels peptides augmente considérablement la complexité de l'analyse des séquences. En particulier, le couplage de l'héparine sur des arginines ou des lysines partagées par plusieurs séquences ne peut être déterminé. Pour éviter cela, les digestions ont été réalisées de façon systématique, avec la thermolysine, une enzyme à large spectre de coupure (clivage en amont des Leu, Phe, Ile, Val, Met, Ala, Tyr, Gly, Thr et Ser), et un traitement préalable par la chaleur, l'urée et le β -mercaptoéthanol a permis de faciliter la dénaturation de la protéine.

Enfin, les peptides ont été identifiés par séquençage N-terminal, basé sur le protocole d'Edman. La méthode a été adaptée pour permettre un séquençage direct sur les billes, en introduisant un filtre dans la chambre réactionnelle afin d'éviter que les billes ne circulent dans tout le système. Les analyses ont montré, à chaque cycle, la présence de nombreux pics non attribués qui correspondent à des fragments d'héparine et de peptides progressivement relargués du fait des conditions stringentes appliquées sur les billes pendant le séquençage. Dans ce sens, les rendements calculés à partir des peptides retrouvés à chaque cycle s'élèvent à 65% (contre 95% pour un séquençage « classique »). Cependant, cette perte de matériel n'a pas affecté la lecture des résultats obtenus. L'avantage principal du séquençage N-terminal adapté aux billes réside dans le fait que les acides aminés couplés peuvent être facilement identifiés puisque ces résidus restent fixés à l'héparine, ne sont pas élués lors du séquençage et, ainsi, sont visualisés par un « blanc » dans les chromatogrammes.

Par ailleurs, du couplage est aussi observé au niveau des arginines, alors que les esters de succinimide ne réagissent qu'avec les amines primaires, limitant normalement le couplage aux lysines. A notre connaissance, un tel couplage sur les arginines n'a jamais été observé. Cependant, la différence entre la méthode développée et le couplage protéine/protéine classique est la présence des groupements sulfates négatifs de l'héparine. De façon

« naturelle », les arginines interagissent fortement avec les sulfates de l'héparine⁸⁹⁴ ; il est possible que l'interaction entre les groupements sulfates du polysaccharide et les arginines induise un rapprochement des groupes carboxyliques activés de l'héparine et des amines des arginines, facilitant ainsi la réaction de couplage.

IV-1.2. Limites et optimisation de la technique

La méthode développée présente certaines limites techniques. Tout d'abord, elle repose sur la formation de complexes stabilisés artificiellement. Néanmoins, aucun couplage non spécifique n'a été observé au cours des différentes analyses, malgré la présence de nombreux résidus basiques dans les protéines testées. Cela démontre la spécificité de la procédure de couplage *via* l'activation de l'héparine par EDC/NHS. Une deuxième limite réside dans le fait que le couplage a uniquement lieu sur les lysines et les arginines et, donc, que la participation éventuelle d'autres résidus ne peut pas être établie.

Les résultats obtenus ont, néanmoins, fourni des données nouvelles et importantes sur les déterminants moléculaires impliqués dans les interactions protéines/héparine, et la méthode des billes peut être considérée comme une approche rapide, facile et efficace. En effet, contrairement à la mutagenèse dirigée, la méthode des billes est prospective, elle ne nécessite pas la pré-sélection des résidus à étudier. De plus, l'analyse est réalisée sur la protéine native, alors que la conformation de mutants peut être altérée et l'utilisation de peptides synthétiques ne prend pas en compte le contexte structural de la protéine entière.

Un certain nombre de développements techniques peuvent être envisagés. Par exemple, les billes pourraient être fonctionnalisées avec d'autres GAG ou bien avec de l'héparine de différentes sources ou structure. Dans ce sens, plusieurs études montrent la formation de conjugués *via* l'extrémité réductrice du saccharide^{895,896}. Il pourrait également être intéressant de fonctionnaliser les billes avec des chaînes d'héparine, *via* un bras espaceur clivable, contenant par exemple un pont disulfure. Cette alternative permettrait de réaliser le couplage, de façon simple, sur un support solide, puis, lors d'une dernière étape de réduction des ponts disulfure, de s'affranchir des billes et de séquencer les peptides en phase liquide. Cette méthode, en cours d'optimisation au laboratoire, présente l'avantage d'éliminer les billes, qui peuvent parfois perturber le séquençage (infiltration dans le séquenceur).

⁸⁹⁴ Fromm, J. R., Hileman, R. E., Caldwell, E. E., Weller, J. M. and Linhardt, R. J. (1995) *Arch Biochem Biophys* **323** (2), 279-287

⁸⁹⁵ Najjam, S., Gibbs, R. V., Gordon, M. Y. and Rider, C. C. (1997) *Cytokine* **9** (12), 1013-1022

⁸⁹⁶ Feizi, T. and Mulloy, B. (2003) *Curr Opin Struct Biol* **13** (5), 602-604

De plus, d'autres techniques pourraient être couplées à la méthode développée : la caractérisation des fragments relargués au cours de la protéolyse pourrait être réalisée par spectrométrie de masse afin d'identifier les peptides manquants, c'est-à-dire ceux impliqués dans le couplage. Cependant, cette approche ne permettrait pas de visualiser de façon précise les résidus engagés dans le couplage. Par ailleurs, le support pourrait également être modifié : la méthode pourrait, par exemple, être adaptée avec des billes magnétiques, dans des plaques 96 puits, afin de permettre un criblage moyen ou haut débit.

IV-1.3. Etude des HBD de RANTES, gC et du fragment α 3LG4/5 de la laminine-5

Deux protéines dont les HBD sont connus ont été utilisées pour valider la méthode. Les résultats obtenus sur la protéine gC du virus de la pseudorange et sur RANTES (9-68) rejoignent ceux déjà publiés^{897,898}. Nos données suggèrent, cependant, que si les séquences ⁷⁵SRRKPPRN⁸² et ⁹⁵AHGRKRI¹⁰¹ de gC correspondent bien aux principaux HBD, le domaine HBD3 de gC (¹³⁵YRRGRFR¹⁴¹) n'a, en revanche, jamais été observé, même en augmentant la concentration de la protéine. Des études de mutagenèse dirigée sur gC ont conduit à l'identification des 3 HBD, indiquant que l'HBD3, seul, est capable de lier l'héparine^{899,897}. En revanche, sa participation n'a pas été observée quand les HBD1 et HBD2 sont présents. Une hypothèse serait que l'organisation structurale de gC ne permet pas la fixation simultanée des trois domaines sur une seule chaîne d'héparine et que les HBD1 et 2 créent, par un effet synergique, un site de plus haute affinité que l'HBD3. L'activité de l'HBD3 observée quand les deux autres domaines sont mutés pourrait également résulter de changements conformationnels induits par les mutations, conduisant à l'exposition d'épitopes normalement masqués. Dans les deux cas, les résultats obtenus avec la méthode des billes remettent en question le rôle de l'HBD3 dans la protéine sauvage. Nos données suggèrent également la contribution de résidus isolés dans la fixation à l'héparine : c'est notamment le cas de la Lys⁹² de gC. La participation de cette lysine, située entre l'HBD1 et l'HBD2, appuie l'hypothèse du rôle synergique de ces deux domaines, conduisant à la formation d'un large site de fixation à l'héparine.

Les résultats obtenus avec RANTES (9-68) confirment le rôle principal de la séquence ⁴⁴RKNR⁴⁷ dans l'interaction avec l'héparine. La modulation des concentrations de RANTES

⁸⁹⁷ Trybala, E., Bergstrom, T., Spillmann, D., Svennerholm, B., Flynn, S. J. and Ryan, P. (1998) *J Biol Chem* **273** (9), 5047-5052

⁸⁹⁸ Proudfoot, A. E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. and Wells, T. N. (2001) *J Biol Chem* **276** (14), 10620-10626

⁸⁹⁹ Flynn, S. J. and Ryan, P. (1996) *J Virol* **70** (3), 1355-1364

(9-68) a également permis d'identifier un site de faible affinité (⁵⁵KKWVR⁵⁹). La présence de ce site pourrait expliquer la fixation résiduelle de la chimiokine mutée sur son HBD principal⁹⁰⁰. Ces résultats sont en accord avec une étude antérieure qui a montré qu'un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope situé dans cette région était inhibé par l'héparine⁹⁰¹. Nos données suggèrent également, qu'à fortes concentrations, du couplage au niveau de la Lys³³ est parfois possible. Récemment, des expériences de co-cristallisation de RANTES et de fragments d'héparine⁹⁰² ont validé le rôle principal du motif ⁴RKNR⁴⁷, mais ont également permis d'identifier d'autres résidus, dont la Lys³³, confirmant une participation éventuelle de ce résidu, à forte concentration protéique.

Enfin, la méthode des billes a été appliquée au fragment α 3LG4/5 de la laminine-5 afin de caractériser son (ou ses) HBD, jusqu'à présent non identifié(s) de façon précise. Nos résultats ont mis en évidence quatre résidus, les deux premiers (Arg⁸³ et Lys⁸⁵) étant situés dans un groupe d'acides aminés basiques. Ces données nous ont permis de proposer un HBD pour cette protéine, constitué de la séquence ⁸⁰KKLRIKSKEK⁸⁹ ainsi que de la Lys¹⁴⁴ et éventuellement des Lys¹⁴² et Lys²⁶⁰. En corrélation avec nos résultats, des études de mutagenèse dirigée réalisées sur d'autres chaînes de la laminine (α 1 et α 4) ont identifié des résidus impliqués dans la fixation à l'héparine et situés dans un domaine correspondant au domaine ⁸⁰KKLRIKSKEK⁸⁹ de la chaîne α 3^{903,904}. En revanche, nos données ne confirment pas les résultats d'une étude suggérant un rôle du peptide ⁵⁹NSFMALYLSKGR⁷⁰ de la chaîne α 3⁹⁰⁵. Néanmoins, ce motif a été identifié par des tests de compétition avec des peptides synthétiques, dans un système où la conformation ainsi que l'exposition de l'épitope dans la protéine entière ne sont absolument pas prises en compte.

La méthode, développée avec des billes-Hp commerciales, présente néanmoins l'inconvénient d'utiliser de l'héparine de structure hétérogène et il paraît, dans certaines conditions, plus judicieux d'étudier l'interaction d'une protéine avec un oligosaccharide bien défini. Dans ce but, plusieurs solutions ont été envisagées : une optimisation du concept avec des billes munies d'un bras espaceur, sur lequel pourraient être fixées des chaînes

⁹⁰⁰ Proudfoot, A. E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. and Wells, T. N. (2001) *J Biol Chem* **276** (14), 10620-10626

⁹⁰¹ Burns, J. M., Gallo, R. C., DeVico, A. L. and Lewis, G. K. (1998) *J Exp Med* **188** (10), 1917-1927

⁹⁰² Shaw, J. P., Johnson, Z., Borlat, F., Zwahlen, C., Kungl, A., Roulin, K., Harrenga, A., Wells, T. N. and Proudfoot, A. E. (2004) *Structure (Camb)* **12** (11), 2081-2093

⁹⁰³ Andac, Z., Sasaki, T., Mann, K., Brancaccio, A., Deutzmann, R. and Timpl, R. (1999) *J Mol Biol* **287** (2), 253-264

⁹⁰⁴ Yamashita, H., Beck, K. and Kitagawa, Y. (2004) *J Mol Biol* **335** (5), 1145-1149

⁹⁰⁵ Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P. K. and Shinkai, H. (2001) *J Biol Chem* **276** (31), 28779-28788

d'oligosaccharide de structure et de taille définies, qui n'a, à l'heure actuelle, pas fourni de résultats satisfaisants, ou l'étude des HBD en solution, en utilisant différents oligosaccharides (ici un dp12). Cette deuxième option est une alternative plus compliquée à mettre en œuvre dans le sens où, sans support solide, le suivi des complexes héparine-peptides et les différentes phases de dénaturation et lavage sont moins faciles à réaliser.

IV-2. Etude des HBD en solution

IV-2.1. Méthodologie

Cette approche est basée, comme la méthode des billes, sur l'activation des groupements carboxyliques de l'héparine avec EDC/NHS, la génération de complexes héparine-protéines et la digestion protéolytique de la protéine immobilisée sur le polysaccharide (pour la discussion, cf IV-1.1.). En revanche, la méthode a dû être adaptée aux conditions en solution. Premièrement, l'héparine (ou l'oligosaccharide) utilisée est un mélange d'héparine marquée à la biotine et d'héparine non marquée ; de cette façon, les complexes formés peuvent être suivis en révélant l'héparine biotinylée. En effet, en analysant les complexes formés, par Dot-Blot, sur une membrane de nitrocellulose, l'héparine non complexée à la protéine n'est pas retenue sur la membrane alors que les complexes le sont. Après activation de l'héparine et formation des complexes, la digestion protéolytique doit être réalisée en solution. Deux techniques ont été testées : digestion sans dénaturation préalable de la protéine ou dénaturation de la protéine par un traitement au β -mercaptoéthanol et à l'urée, à 60°C, suivie d'un déssalage de l'échantillon sur une colonne Pd10, puis d'une digestion par la thermolysine. La première méthode présente l'avantage de réaliser la protéolyse de façon simple, mais, la protéine n'étant pas dénaturée, les sites de restriction sont moins accessibles et la digestion risque de ne pas être complète. La dénaturation préalable de la protéine permet de pallier ce problème. En revanche, les agents dénaturants doivent être éliminés pour ne pas agir sur l'enzyme ; cette étape de déssalage constitue une étape supplémentaire et diminue donc le rendement de la réaction.

Après digestion protéolytique, les peptides non complexés à l'héparine doivent être éliminés. Cette étape, précédemment réalisée par simple centrifugation et lavage des billes, nécessite ici une purification des complexes par chromatographie échangeuse d'anions, avec une résine de DEAE. Plus compliquée à mettre en œuvre, cette étape est néanmoins bien maîtrisée et les complexes peuvent être suivis en analysant, sur une membrane de nitrocellulose, la présence d'héparine biotinylée dans les fractions éluées. Les complexes

héparine-peptides sont élués dans 3 à 4 mL de tampon 1M NaCl, il faut donc déssaler l'échantillon puis le concentrer à un volume inférieur à 100 µL, afin de séquencer les peptides retenus. Ce procédé de déssalage-purification-déssalage est plus lourd à mettre en œuvre que la méthode des billes et une partie des complexes est perdue à chaque étape, diminuant la quantité à séquencer. Le rendement de ces étapes n'a pas été calculé de façon précise mais est estimé à environ 50%. Cette approche alternative présente néanmoins l'avantage considérable de réaliser le séquençage, de façon classique, en solution. L'échantillon est déposé sur un filtre, par gravité, qui est ensuite placé dans le séquenceur. Contrairement à la méthode des billes, les pics non attribués sont beaucoup moins nombreux. Les rendements de chaque cycle de séquençage s'élèvent, comme pour la méthode des billes, à environ 65%, un rendement moins élevé que du séquençage « classique » mais généralement suffisant pour analyser des peptides de 10 à 15 résidus.

IV-2.2. Etude des HBD de RANTES et gp120

Deux protéines ont été étudiées par cette approche : RANTES (9-68), afin de valider la méthode en solution, et gp120, seule ou en complexe avec CD4. L'étude de RANTES (9-68) a permis de valider la séquence ⁴⁴RKNR⁴⁷ comme principal HBD et le peptide ⁵⁵KKWVR⁵⁹ comme site de plus faible affinité pour l'héparine. L'étude des HBD en solution peut donc être considérée comme une alternative fiable à la méthode des billes et être appliquée avec différents oligosaccharides.

Cette approche a ensuite permis d'étudier les sites d'interaction de gp120 avec l'héparine. A l'heure actuelle, deux domaines d'interaction ont été caractérisés : la boucle V3 et l'épitope CD4i. Néanmoins, les motifs précis et les résidus engagés dans l'interaction n'ont, jusqu'à présent, pas été identifiés. Seule une étude⁹⁰⁶ a montré que l'Arg²⁹⁸, située au début de la boucle V3, était responsable de l'interaction du VIH avec les syndécans exprimés à la surface cellulaire.

L'étude des HBD de gp120, réalisée en solution, a fourni trois séquences ¹⁶⁵IRGKVQKEYAFFY¹⁷⁷, appartenant à la boucle V1/V2, ²⁹²VEINCTRPNNNTRKRIR³⁰⁸, motif situé sur la boucle V3 et ⁴⁹⁶VAPTKAKRR⁵⁰⁴, un peptide du domaine C5 de gp120. Ces résultats valident donc la boucle V3 comme site d'interaction avec l'héparine, avec un motif consensus XBBBXXBXBX (ou B est un acide aminé basique) déjà observé dans l'interaction

⁹⁰⁶ de Parseval, A., Bobardt, M. D., Chatterji, A., Chatterji, U., Elder, J. H., David, G., Zolla-Pazner, S., Farzan, M., Lee, T. H. and Gallay, P. A. (2005) *J Biol Chem* **280** (47), 39493-39504

PRV gC/héparine⁹⁰⁷. Le peptide séquencé comprend notamment l'Arg²⁹⁸ décrite comme site d'interaction avec les syndécans. En revanche, les deux autres HBD, situés sur la boucle V1/V2 et la partie C-terminale, n'ont auparavant jamais été identifiés de manière formelle. Peu de travaux ont néanmoins visé la caractérisation de ces sites. Dans le sens de nos résultats, Moulard *et al.*⁹⁰⁸ ont montré que, outre la boucle V3, la boucle V1/V2, la partie N-terminale et/ou le domaine C-terminal étaient susceptibles de constituer des sites d'interaction secondaires. En effet, des mutants délétés de ces trois domaines fixent moins bien l'héparine que la forme sauvage. De plus, l'héparine est capable de bloquer la fixation d'un anticorps anti-V2 sur gp120, suggérant que cette région pourrait interagir avec le polysaccharide. Les premiers résultats obtenus en modulant la concentration de gp120 (de 3,5 µM à 500 nM) suggèrent, par ailleurs, que l'HBD localisé dans la boucle V1/V2 pourrait constituer un site de plus faible affinité, car il n'est pas détecté à une concentration de 500 nM.

Récemment, une équipe⁹⁰⁹ a suggéré que l'héparine se fixe à la partie C-terminale de gp120, au niveau des deux sites potentiels de clivage de la jonction gp120/gp41 (⁴⁹⁶VAPT**KAKRR**VVQ**REKR**⁵¹¹), facilitant ainsi l'accessibilité du site REKR (site de coupure préférentiel) à la furine (cf bibliographie II-1.1.).

Il est à présent nécessaire de poursuivre la caractérisation et l'implication relative de ces HBD potentiels en réalisant, par exemple, des expériences de mutagenèse dirigée sur les résidus basiques de ces peptides, puis en analysant leur interaction avec l'héparine, au cours d'études SPR. Il faudra également valider l'importance physiologique de ces deux nouveaux domaines et comprendre s'ils jouent un rôle au sein de la protéine trimérique. Plusieurs équipes^{910,911} s'accordent à dire que la boucle V1/V2 ainsi que le domaine C-terminal sont exposés à la surface du trimère, ce qui suggère que, dans le complexe trimérique, ces régions pourraient être accessibles à l'héparine. De plus, dans le sens de nos résultats, une étude annexe⁹¹² concernant la coupure protéolytique de gp120 (cf bibliographie II-1.1.) montre que le domaine C-terminal de gp120 est sujet à un clivage, suite à la fixation de CD4, dans la protéine monomérique mais également dans le virus entier. Ces travaux laissent penser que la partie C-terminale est accessible dans la protéine trimérique et peut donc être potentiellement ciblée par l'héparine.

⁹⁰⁷ Flynn, S. J. and Ryan, P. (1995) *J Virol* **69** (2), 834-839

⁹⁰⁸ Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D. and Sattentau, Q. J. (2000) *J Virol* **74** (4), 1948-1960

⁹⁰⁹ Pasquato, A., Dettin, M., Basak, A., Gambaretto, R., Tonin, L., Seidah, N. G. and Di Bello, C. (2007) *FEBS Lett*, in press

⁹¹⁰ Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. and Harrison, S. C. (2005) *Nature* **433** (7028), 834-841

⁹¹¹ Zanetti, G., Briggs, J. A., Grunewald, K., Sattentau, Q. J. and Fuller, S. D. (2006) *PLoS Pathog* **2** (8), 83

⁹¹² Barbouche, R., Decroly, E., Kieny, M. P. and Fenouillet, E. (2000) *Virology* **273** (1), 169-177

La méthode a, dans un second temps, été appliquée à des complexes gp120/CD4 et a permis d'identifier les trois peptides déjà séquencés en analysant gp120 non liée à CD4. Il est intéressant de noter qu'un quatrième peptide ²⁹⁶CTRPNNNTRKR³⁰⁸, chevauchant la séquence ²⁹²VEINCTRPNNNTRKRIR³⁰⁸, a également été caractérisé. Ces deux peptides appartiennent à la boucle V3 et la présence du peptide tronqué de quatre résidus en N-terminal pourrait provenir d'un déplacement de V3, induit par la fixation de CD4 sur gp120, rendant V3 plus accessible et donc plus sensible à la protéolyse. En effet, plusieurs équipes ont montré que la fixation de CD4 sur gp120 favorisait le clivage protéolytique de la boucle V3^{913,914}.

En revanche, aucun peptide appartenant à l'épitope CD4i n'a pu être identifié. Les peptides séquencés étant relativement longs (20 résidus au moins), nous nous sommes interrogés sur la capacité de la thermolysine à protéolyser efficacement la protéine en conditions « natives » et nous avons émis l'hypothèse que si la protéine n'était pas clivée de façon efficace, les peptides pouvaient s'étendre sur plus de 100 ou 150 résidus et inclure les résidus du site CD4i (par exemple les acides aminés R419, K421 et K432 sont situés à environ 120 à 140 résidus du début de la boucle V3). Pour éviter cela, une étape de dénaturation à la chaleur, à l'urée et au β-mercaptoéthanol a été réalisée préalablement à la digestion protéolytique, et la quantité de thermolysine a été augmentée. Ces conditions de digestion plus drastiques ont généré des peptides plus courts (moins de 10 résidus) mais pas de nouvelle séquence, éliminant le postulat émis ci-dessus. Une deuxième explication envisagée a résidé dans le fait que l'héparine utilisée est relativement longue et pourrait interagir avec les sites protéiques les plus en surface, ce premier pontage empêchant alors l'héparine de se fixer sur des sites plus enfouis, tels que l'épitope CD4i. Pour vérifier cette hypothèse, l'héparine a été remplacée par un dodécasaccharide (dp12) d'héparine. Cette modification n'a cependant pas conduit à l'identification d'un HBD au niveau de CD4i. La question qui se pose, à l'heure actuelle, est de savoir si un dp12 est encore trop long pour aller interagir avec CD4i. Pour cela, nous envisageons de diminuer encore la taille de l'oligosaccharide (éventuellement un dp8).

Il est, par ailleurs, envisageable que les complexes gp120/CD4 formés préalablement soient déstabilisés lorsqu'ils sont mis au contact de l'héparine activée. Pour contourner cet obstacle, la méthode pourrait être utilisée sur des gp120 dites « CD4-indépendantes », qui

⁹¹³ Clements, G. J., Price-Jones, M. J., Stephens, P. E., Sutton, C., Schulz, T. F., Clapham, P. R., McKeating, J. A., McClure, M. O., Thomson, S., Marsh, M. and et al. (1991) *AIDS Res Hum Retroviruses* **7** (1), 3-16

⁹¹⁴ Sattentau, Q. J. and Moore, J. P. (1991) *J Exp Med* **174** (2), 407-415

restent toujours dans la conformation « ouverte » et dont le site CD4i est constitutivement exposé.

Ainsi, à l'heure actuelle, cette méthode n'a pas permis d'identifier les résidus de l'épitope CD4i engagés dans l'interaction avec l'héparine. C'est donc une approche qui permet d'étudier des interactions protéines/héparine « simples », mais elle semble plus complexe à mettre en œuvre pour étudier des HBD démasqués par une interaction protéine/protéine séquentielle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un nombre croissant d'études propose que les héparanes sulfate présents à la surface cellulaire participent à l'attachement du VIH sur la cellule cible. Plusieurs équipes ont montré que cette interaction est réalisée, en premier lieu, *via* la boucle V3 du virus. Puis, un second site d'interaction, l'épitope CD4i, a été proposé. Des données de modélisation moléculaire, réalisées en collaboration avec le CERMAV (Grenoble), ont suggéré que quatre résidus du site CD4i pouvaient potentiellement interagir avec les HS. Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à vérifier l'engagement de chacun de ces acides aminés dans la fixation aux HS.

Nos travaux nous ont permis de valider l'interaction de l'épitope CD4i avec les HS et d'identifier trois résidus engagés dans cette interaction : R419, K421 et K432. Le quatrième acide aminé suggéré par les études de modélisation moléculaire (K121) ne semble, en revanche, pas participer directement à la fixation des HS. Ces résultats démontrent que le site CD4i peut être ciblé de façon particulièrement efficace par des molécules dérivées des HS. Des travaux ont déjà visé le développement de tels composés. Néanmoins, les recherches sont limitées par le fait que les souches de tropisme R5, majoritaires au début de l'infection, n'interagissent que faiblement avec les HS, *via* leur boucle V3. En revanche, l'épitope CD4i, masqué dans la conformation de gp120 non liée à CD4, est fortement conservé entre les isolats de différent tropisme et interagit avec les HS. A partir de ces données, le laboratoire a déposé un brevet (brevet CNRS-CEA déposé le 19/04/2002 sous le n° 02 04926) sur une molécule hybride, constituée d'un fragment de CD4 soluble couplé à un oligosaccharide d'HS, comme inhibiteur de l'interaction gp120/corécepteur (figure 86). Dans cette molécule, le rôle de la partie CD4 est « d'ouvrir » gp120 afin d'exposer l'épitope CD4i sur lequel pourra alors se fixer la partie de type HS. Un tel composé pourrait ainsi permettre le blocage simultané des deux sites majeurs d'interaction de gp120 sur les cellules hôtes, à savoir le site de fixation de CD4 et des corécepteurs.

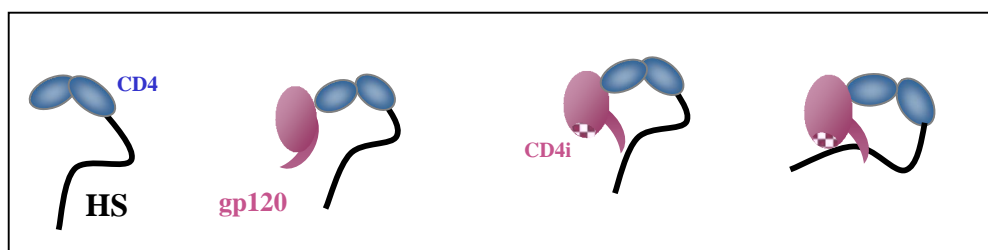


Figure 85 : Concept de la molécule hybride CD4-HS brevetée

Nos travaux ont permis de caractériser le partenaire protéique de l'interaction CD4i/HS. Il est à présent nécessaire de déterminer la taille et la nature des chaînes

saccharidiques les mieux adaptées pour bloquer l'épitope CD4i de façon efficace. Ces travaux ont été débutés au laboratoire et ont permis de suggérer, par des études SPR, que la longueur optimale de la chaîne d'HS se situait entre 12 et 14 saccharides. Il est également essentiel de déterminer les motifs saccharidiques précis permettant de fixer gp120 avec une forte affinité, mais de façon spécifique.

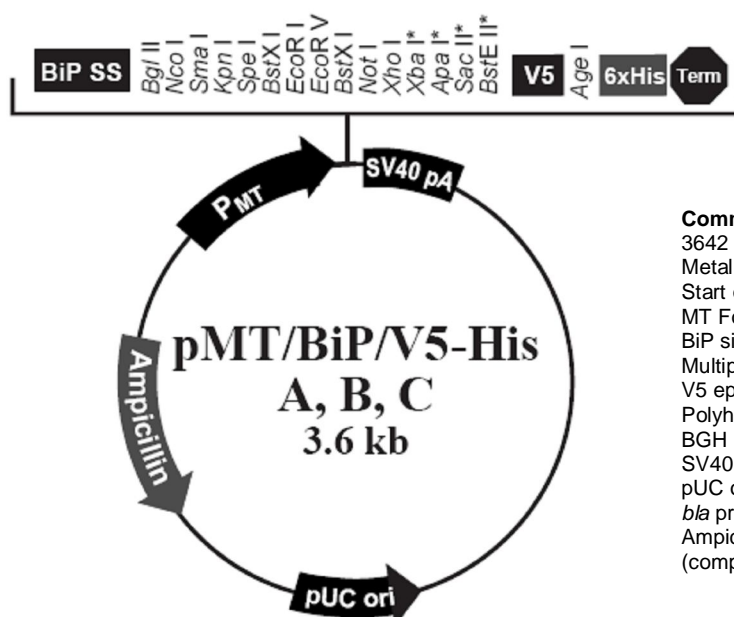
Par ailleurs, nous avons également développé une technique permettant, de façon simple, d'identifier les domaines de fixation à l'héparine (ou HBD) sur une protéine donnée. Cette méthode, mise au point avec des billes portant des chaînes d'héparine, a par la suite été modifiée afin de s'affranchir du support « billes », pour des raisons techniques. Ces deux approches ont été validées en utilisant des protéines dont les sites de fixation à l'héparine sont bien caractérisés. Puis, les HBD de gp120 ont été étudiés. Trois peptides ont été identifiés, l'un inclu dans la boucle V3, site de fixation à l'héparine déjà bien connu. Les deux autres, en revanche, n'avaient, jusqu'à présent, jamais été décrits. Il est désormais nécessaire de valider l'engagement de ces nouveaux sites dans la fixation à l'héparine, notamment en étudiant l'implication relative des résidus basiques de ces domaines, par des expériences de mutagenèse dirigée et des analyses en SPR.

Ces travaux se sont inscrits dans un contexte général où la compréhension des mécanismes de l'entrée virale devient un enjeu majeur pour la recherche d'inhibiteurs. En effet, un nombre croissant de composés visent les premières étapes de l'infection par le virus, à savoir son attachement à la surface des cellules et l'étape de fusion des membranes virale et cellulaire. Il est maintenant avéré que les HSPG exprimés par les cellules participent à l'attachement du virus ; les sites de gp120 engagés dans l'interaction avec les HS ont été définis et ces résultats permettent d'envisager des stratégies basées sur l'inhibition de l'entrée virale par des dérivés d'HS solubles.

ANNEXES

Annexe I : Cartes des plasmides

- a) pMT/Bip/V5-His
- b) pCoHygro
- c) TOPO
- d) pFastBac
- e) pNT-Bac



Comments for pMT/BiP/V5-His A

3642 nucleotides

Metallothionein promoter: bases 412-778

Start of transcription: base 778

MT Forward priming site: bases 814-831

BiP signal sequence: bases 851-904

Multiple cloning site: bases 906-999

V5 epitope tag: bases 1003-1044

Polyhistidine region: bases 1054-1074

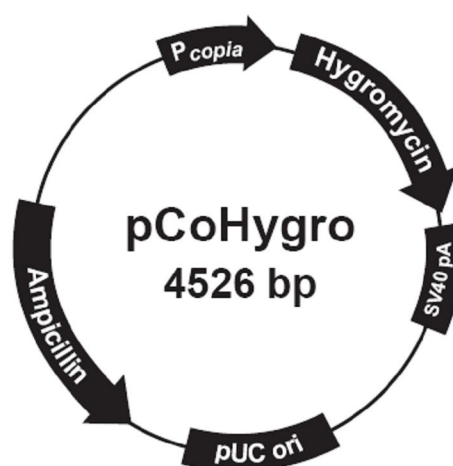
BGH Reverse priming site: bases 1094-1111

SV40 late polyadenylation signal: bases 1267-1272

pUC origin: bases 1765-2438 (complementary strand)

bla promoter: bases 3444-3542 (complementary strand)

Ampicillin (*bla*) resistance gene ORF: bases (complementary strand)



**Comments for pCoHygro
4526 nucleotides**

copia promoter: bases 500-746

Hygromycin resistance gene: bases 781-1830

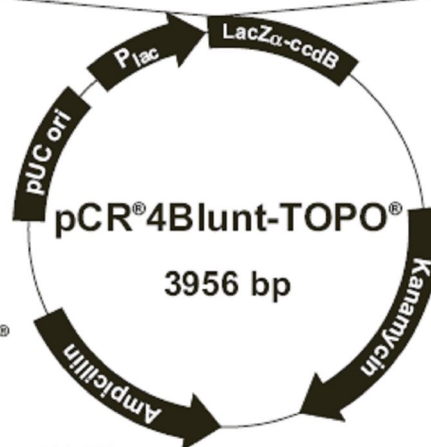
SV40 early polyadenylation sequence: bases 2146-2280

pUC origin: bases 2648-3321 (complementary strand)

Ampicillin (*b/a*) resistance gene: bases 3466-4326 (complementary strand)

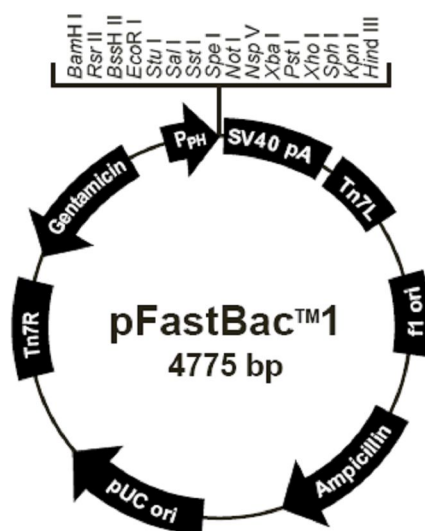
b/a promoter: bases 4327-4425 (complementary strand)

M13 Reverse priming site LacZα initiation codon T3 priming site
 201 CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTCA GAATTAACCC TCACTAAAGG
 GTGTGTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CGGTCGAGT CTTAATTGGG AGTGATTTC
 Spe I Pst I Pme I EcoR I Blunt PCR Product EcoR I Not I
 261 GACTAGTCCT GCAGGTTTAA ACGAATTGCG CCTT AAGGGC GAATTCGCGG
 CTGATCAGGA CGTCCAAATT TGCTTAAGCG GGAA TTCCCG CTTAAGCGCC
 T7 priming site M13 Forward (-20) priming site
 311 CCGCTAAATT CAATTGCGCC TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCCTGGCC GTCGTTTAC
 GGCGATTAA GTTAAGCGGG ATATCACTCA GCATAATGTT AAGTGACCGG CAGCAAAATG



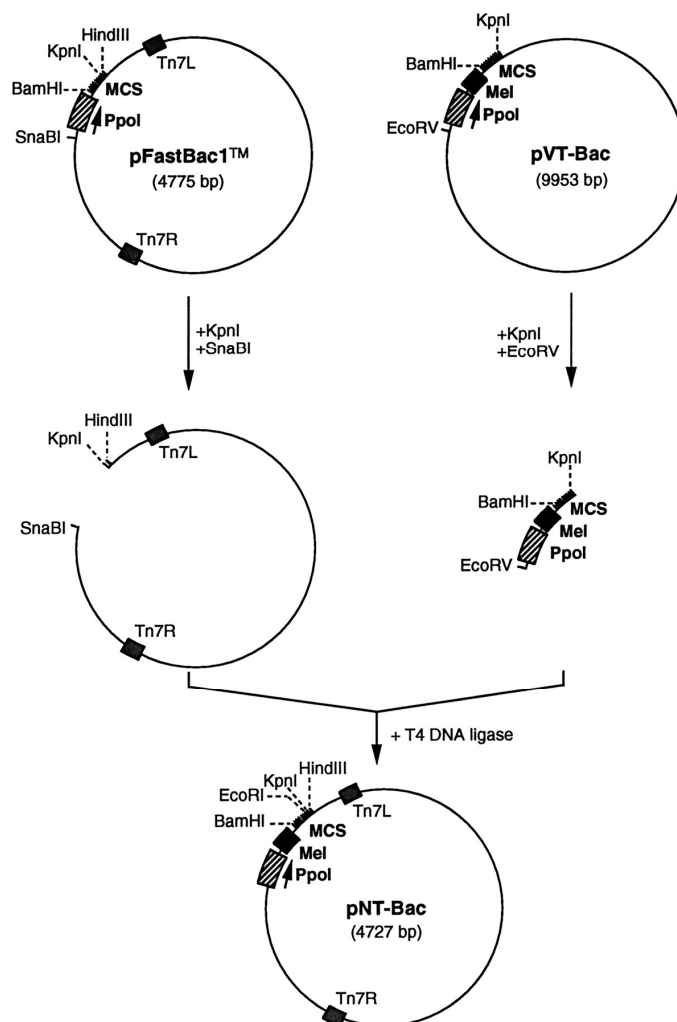
**Comments for pCR®4Blunt-TOPO®
3956 nucleotides**

lac promoter region: bases 2-216
 CAP binding site: bases 95-132
 RNA polymerase binding site: bases 133-178
 Lac repressor binding site: bases 179-199
 Start of transcription: base 179
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 LacZα-*ccdB* gene fusion: bases 217-810
 LacZα portion of fusion: bases 217-497
 ccdB portion of fusion: bases 508-810
 T3 priming site: bases 243-262
 TOPO® Cloning site: bases 294-295
 T7 priming site: bases 328-347
 M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
 Kanamycin promoter: bases 1021-1070
 Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)
 Ampicillin (*bla*) promoter: bases 3064-3160 (c)
 pUC origin: bases 3161-3834
 (c) = complementary strand



Comments for pFastBac™1
4775 nucleotides

f1 origin: bases 2-457
 Ampicillin resistance gene: bases 589-1449
 pUC origin: bases 1594-2267
 Tn7R: bases 2511-2735
 Gentamicin resistance gene: bases 2802-3335 (complementary strand)
 Polyhedrin promoter (P_{PH}): bases 3904-4032
 Multiple cloning site: bases 4037-4142
 SV40 polyadenylation signal: bases 4160-4400
 Tn7L: bases 4429-4594



Conception du plasmide pNT-Bac à partir des vecteurs pFastBac et pVT-Bac

Annexe II : Séquences de gp120

- a) séquence nucléotidique de gp120
- b) séquence protéique de gp120 détaillée

ATGAGAGTGAAGGAGAAATATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGG
GATGTTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGA
 AGCAACCACCACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACAC
 ATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAAGTAGTATTGGTAAATGTGACAGAAAAATTTTAAACATGTG
 GAAAAATGACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTA
 AAATTAACCCCACTCTGTGTTAGTTTAAAGTGCACTGATTTGAAGAATGATACTAATACCAATAGTAGTAGCGG
 GAGAATGATAATGGAGAAAGGAGAGATAAAAAACTGCTCTTTCAATATCAGCACAAAGCATAAGAGGTAAGGT
 GCAGAAAGAATATGCATTTTTTTTATAAACTTGATATAATACCAATAGATAATGATACTACCAGCTATAAGTTGA
 CAAGTTGTAACACCTCAGTCATTACACAGGCCTGTCCAAAGGTATCCTTTGAGCCAATTCCCATACATTATTGT
 GCCCCGGCTGGTTTTTGCATTCTAAAATGTAATAATAAGACGTTCAATGGAACAGGACCATGTACAAATGTCA
 GCACAGTACAATGTACACATGGAATTAGGCCAGTAGTATCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGA
 AGAAGAGGTAGTAATTAGATCTGTCAATTTACGGACAATGCTAAAACCATAATAGTACAGCTGAACACATCT
 GTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGAATCCGTATCCAGAGAGGACCAGGGAGA
 GCATTTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAAT
 AACACTTTAAACAGATAGCTAGCAAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAAT
 CCTCAGGAGGGGACCCAGAAATTGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATTCAACA
 CAACTGTTTAATAGTACTTGGTTTAATAGTACTTGGAGTACTGAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAAGTGACA
 CAATCACCCCTCCCATGCAGAATAAAACAAATTATAAACATGTGGCAGAAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCC
 TCCCATCAGTGGACAAATTAGATGTTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAGC
 AACAATGAGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAA
 TATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAA
 AAAAGA

En gras : séquence signal de gp120

Séquence nucléotidique de gp120

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATT
LFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLV**NVTENFNMWKNDMVEQMH**
EDIISLWDQSLKPCVKLTPLCV**SLKCTDLK****NDTNT****NSSSGRMIMEKGEIK****NCSF****NISTSI**
RGKVQKEYAFFYKLDIIPID**NDTTSYKLT****SCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAI**
LKCN**NKTF****NGTGPCT****NVSTVQCTHGIRPVVSTQLLL****NGSLAEEEEVVIRSV****NFTD****NAKT**
IIVQL**N****TSVEI****NCT****RPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQA****HC****NISRAKW****NNTL**
KQIASKLREQFGN**NKTIIFKQSSGGDPE****IVTHSFNCGGEFFYC****NSTQLF****NSTWF****NSTWS**
TEGS**N****TEGSDTITLPCRIKQIINMWQKV****GKAMY****APPISGQIRCSS****NITGLLL****TRDGGN**
SN**NESEIF****RP****GGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR**

En gras : séquence signal de gp120

V1V2

V3

R résidus du site CD4i mutés

N asparagines portant une glycosylation (souche HXBc2)

X Acides aminés engagés dans l'interaction avec les corécepteurs (Decker *et al.*, 2005)

X Acides aminés engagés dans l'interaction avec CD4 (Decker *et al.*, 2005)

Séquence protéique de gp120

Annexe III :

Nom de l'amorce	Séquence	Site de restriction
gp1	5'-GCGGGATCCAACAGAAAAATTGTGGGTC-3'	BamHI
gpS2-2	5'-ATCTCGAGTCATCTTTTTTCTCTTCGCACCAC-3'	XhoI
gp2	5'-CGCAAGCTTTCATCTTTTTTCTCTCTGCACCAC-3'	HindIII
egt1	5'-GACTCTAGAATGACTATTCTCTGCTGGCTTGCACTGCTGTCTACGCTTAC-3'	XbaI
egt2	5'-TGCTGTCTACGCTTACTGCTGTAAATGCGACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTC-3'	/
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	/
M13 forward	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	/

Tableau récapitulatif des amorces utilisées au cours des clonages

	Gel de concentration (5%) Volumes des composants (ml) pour 6 ml de gel	Gel de migration (10 %) Volumes des composants (ml) pour 20 ml de gel
Eau distillée	7,9	4,1
30% acrylamide mix	6,7	1
1.5 M Tris pH 8,8	5	-
1 M Tris pH 6,6	-	0,75
10% SDS	0,2	0,06
10% ammonium Persulfate	0,2	0,06
TEMED	0,008	0,006

Tableau récapitulatif des conditions utilisées pour la réalisation d'un gel SDS-PAGE 10%

Annexe IV : Principe de la mutagénèse dirigée

Step 1
Plasmid Preparation



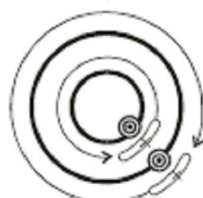
Gene in plasmid with
target site (⊙) for mutation

Step 2
Temperature Cycling



Mutagenic
primers

Denature the plasmid and anneal the
oligonucleotide primers (↯) containing
the desired mutation (×)



Using the nonstrand-displacing
action of *PfuTurbo* DNA polymerase,
extend and incorporate the
mutagenic primers resulting
in nicked circular strands

Step 3
Digestion



Mutated plasmid
(contains nicked
circular strands)

Digest the methylated, nonmutated
parental DNA template with *Dpn* I

Step 4
Transformation



Transform the circular, nicked dsDNA
into XL1-Blue supercompetent cells

After transformation, the XL1-Blue
supercompetent cells repair the
nicks in the mutated plasmid

LEGEND

- Parental DNA plasmid
- Mutagenic primer
- Mutated DNA plasmid

Annexe V : Publications